



Université de Sherbrooke

**Activités anticancéreuses des antagonistes perméants des récepteurs B1 et B2 des kinines dans un modèle cellulaire de cancer du sein triple-négatif**

par

Céléna Dubuc

Département de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae* Doctor (Ph.D.) en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada

10 mars 2015

Membres du jury d'évaluation

Michel Grandbois, Président du jury, Département de Pharmacologie

Fernand Gobeil jr, Département de Pharmacologie

Marie-Josée Boucher, Département d'anatomie et biologie cellulaire

Benoit Boivin, Université de Montréal

## RÉSUMÉ

Activités anticancéreuses des antagonistes perméants des récepteurs B1 et B2 des kinines dans un modèle cellulaire de cancer du sein triple-négatif.

**Céléna Dubuc**

Département de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en pharmacologie, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont des protéines de surfaces intégrales qui jouent un rôle central dans la croissance et la progression tumorale ainsi que la formation de métastases. Toutefois, plusieurs de ces RCPGs possèdent une localisation intracellulaire/nucléaire atypique dans plusieurs types de cancers. La signification pathologique de cette localisation demeure inconnue encore à ce jour. Les données exploratoires obtenues dans notre laboratoire démontrent que les récepteurs RCPG nucléaires des kinines, rB1 et rB2, sont surexprimés dans des lignées de cancer du sein agressives triple-négatives telles que les MDA-MB-231 ainsi que des spécimens cliniques. En nous basant sur ces données, nous avons émis l'hypothèse que ces récepteurs «nucléarisés» sont impliqués dans la signalisation oncogénique liée à la croissance aberrante et le maintien de la survie des cellules de cancer du sein. Nous avons caractérisé d'une part de nouveaux antagonistes perméants des récepteurs B1 et B2 des kinines et d'autre part, démontré leur efficacité supérieure par rapport aux antagonistes non perméants à inhiber la prolifération et à induire l'apoptose des cellules MDA-MB-231. Certains de ces antagonistes perméants ont démontré *in vitro* des activités anticancéreuses supérieures aux agents chimiothérapeutiques actuellement utilisés en clinique. De plus, ces antagonistes perméants ont montré peu ou pas d'effets sur deux lignées cellulaires n'exprimant pas les récepteurs des kinines soit les MCF-10A, une lignée cellulaire normale du sein ainsi que sur les COS-1 une lignée cellulaire normale de rein de singe indiquant ainsi une spécificité de leur action. L'incubation des cellules avec les antagonistes perméants entraîne des modifications dans l'activité de certaines kinases (ex. p38) ainsi que dans l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire et l'apoptose. Nous avons également utilisé des cellules knockdown (de rB2 uniquement) pour d'une part, consolider la spécificité d'action des nouveaux antagonistes perméants et d'autre part, démontrer l'importance des récepteurs des kinines dans la croissance des cellules tumorales *in vitro*. Nos résultats montrent un rôle central des récepteurs intracellulaires/nucléaires des kinines dans la prolifération et le maintien de la viabilité des cellules de cancer du sein. Les données obtenues montrent également l'importance de cibler un RCPG en fonction de sa localisation subcellulaire pour obtenir une meilleure efficacité dans le traitement du cancer.

Mots clés : cancer du sein, kinines, antagonistes perméables, RCPGs nucléaires, signalisation intracrine

*The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not “Eureka!” but “that’s funny...”*

*-Isaac Asimov*

## *Table des matières*

RÉSUMÉ .....	IV
LISTE DES FIGURES .....	VI
LISTE DES TABLEAUX .....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	IX
PRÉAMBULE .....	1
CHAPITRE 1 .....	2
Le système kalllicréines-kinines (SKK) .....	2
1. Kalllicréines .....	2
2. Kininogènes .....	3
3. Kinines .....	5
3.1 Métabolisme .....	5
4. Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG): les récepteurs des kinines .....	7
4.1 rB2 .....	10
4.1.1 Régulation et désensibilisation .....	11
4.1.2 Voies de signalisation .....	12
4.1.3 Distribution et fonctions physiologiques/pathologiques .....	14
4.2 rB1 .....	14
4.2.1 Régulation et désensibilisation .....	14
4.2.2 Voies de signalisation .....	15
4.2.3 Distribution et fonctions physiologiques/pathologiques .....	17
5. Pharmacologie des récepteurs des kinines .....	18
5.1 Agonistes et antagonistes des rB2 .....	18
5.2 Agonistes et antagonistes des rB1 .....	19
6. Kinines et cancers .....	22
6.1 Cancer du cerveau .....	23
6.2 Cancer de la prostate .....	24
6.3 Cancer du sein .....	24
6.3.1 Cancer du sein triple-négatif .....	26
CHAPITRE 2 .....	28

Signalisation intracrine et Récepteurs couplés aux protéines G nucléaires.....	28
1. Théorie de l'action intracrine.....	28
2. RCPGs nucléaires .....	29
2.1 Origines des RCPGs nucléaires .....	33
3. Stratégies de couplage des ligands peptidiques pour traverser les membranes cellulaires.....	36
3.1 Vecteurs peptidiques (ou peptides pénétrants (PP) les cellules).....	36
CHAPITRE 3.....	39
Hypothèse et objectifs.....	39
CHAPITRE 4.....	41
Matériel et méthodes.....	41
CHAPITRE 5.....	52
Résultats.....	52
1. Partie 1: rB2.....	52
2. Partie 2: rB1.....	79
CHAPITRE 6.....	93
Discussion et conclusion.....	93
RÉFÉRENCES .....	120
ANNEXES.....	163

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Le système kallibréines-kinines. ....	4
Figure 2: Métabolisme de la LysBK (agoniste B2) et LDBK (agoniste B1) par diverses peptidases (aussi appelées kininases). ....	6
Figure 3: Classification des RCPGs.....	8
Figure 4: Réseau de signalisation des RCPGs dépendants des protéines G. ....	9
Figure 5: Les différentes voies de signalisation activées par rB2.....	13
Figure 6: Différents modes d'action intracrine. ....	29
Figure 7: Origines potentielles des RCPGs nucléaires. ....	35
Figure 8: Expression de rB2 chez diverses lignées humaines de cancer du sein.....	54
Figure 9: Localisation subcellulaire de rB2 chez les MDA-MB-231.....	56
Figure 10: Présence cytoplasmique de certaines composantes du SKK dans les cellules MDA-MB-231. ....	58
Figure 11: Localisation subcellulaire de rB2 chez des spécimens cliniques de cancer du sein triple-négatif.....	60
Figure 12: Structures chimiques des antagonistes rB2 utilisés dans le cadre de ce projet. ..	62
Figure 13: Effets des antagonistes et agonistes de rB2 sur le potentiel clonogénique des cellules MDA-MB-231. ....	64
Figure 14: Effets des antagonistes rB2 perméants sur la prolifération et la viabilité cellulaire des cellules MDA-MB-231.....	66
Figure 15: Effets des antagonistes rB2 perméants sur l'induction de l'apoptose et de la sénescence chez des cellules MDA-MB-231 et COS-1.....	68
Figure 16: Effets des antagonistes rB2 perméants sur diverses voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et le cycle cellulaire. ....	70
Figure 17: Implication de la voie de p38 MAPK et p27 <sup>kip1</sup> dans les effets anti-clonogéniques et anti-prolifératifs des antagonistes rB2 chez les cellules MDA-MB-231..	72
Figure 18: Effet du knockdown du gène de rB2 sur la prolifération et le potentiel clonogénique des cellules MDA-MB-231. ....	76
Figure 19: Effets des antagonistes rB2 perméants sur la prolifération et la viabilité cellulaire chez une lignée knockdown rB2 de MDA-MB-231.....	78
Figure 20: Expression de rB1 chez diverses lignées humaines de cancer du sein.....	80
Figure 21: Localisation intracellulaire/nucléaire de rB1 chez des spécimens cliniques de cancer du sein triple-négatif.....	82
Figure 22: Structures chimiques des antagonistes rB1 utilisés dans le cadre de ce projet. ..	84
Figure 23: Effets des antagonistes rB1 sur le potentiel clonogénique des MDA-MB-231. ....	86
Figure 24: Effets des antagonistes rB1 perméants sur la prolifération et la viabilité cellulaire des cellules MDA-MB-231.....	88
Figure 25: Effets des antagonistes rB1 perméants sur l'induction de l'apoptose des cellules MDA-MB-231 et COS-1. ....	90
Figure 26: Modèle hypothétique des mécanismes d'action des antagonistes des kinines chez les cellules MDA-MB-231.....	111
Figure 27: Implication de la caspase 3 dans les mécanismes d'action de l'antagoniste rB1 SSR240612. ....	165
Figure 28: Implication des caspases dans l'effet anti-prolifératif de l'antagoniste perméant rB1 SSR240612. ....	165

Figure 29: Effets <i>in vivo</i> de l'antagoniste rB2 perméant FR173657 chez les souris balb/c nu/nu porteuses de xénogreffes de cancer du sein MDA-MB-231.....	169
Figure 30: Effet de l'inactivation du gène rB2 (shRNA1) sur la croissance tumorale de MDA-MB-231. ....	171

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1: Principaux agonistes et antagonistes synthétiques des rB1 et rB2 des kinines ..	21
Tableau 2: Caractéristiques des différentes lignées mammaires utilisées dans cette étude..	53
Tableau 3: Caractéristiques pharmacologiques et physicochimiques des antagonistes rB2 des kinines utilisés dans le cadre de ce projet.....	62
Tableau 4: Comparaison des activités cytotoxiques des antagonistes rB2 avec des agents chimiothérapeutiques utilisés en clinique dans le traitement du cancer du sein.....	74
Tableau 5: Synergie entre les antagonistes perméants rB2 et des agents chimiothérapeutiques commerciaux. ....	74
Tableau 6: Caractéristiques pharmacologiques et physicochimiques des antagonistes rB1 des kinines utilisés dans le cadre de ce projet.....	84
Tableau 7: Comparaison des activités cytotoxiques des antagonistes rB2 avec des agents chimiothérapeutiques utilisés en clinique dans le traitement du cancer du sein.....	92
Tableau 8: Synergie entre les antagonistes perméants rB1 et des agents cytotoxiques commerciaux.....	92

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA: acides aminés  
 AC: adénylate cyclase  
 ADN: acide désoxyribonucléique  
 AmM: aminopeptidase M  
 AmN: aminopeptidase N  
 AmP: aminopeptidase P  
 Ang-1: angiopoïétine-1  
 ARF: facteur de ribosylation de l'ADP  
 ARNm: ARN messenger  
 AT1/2: récepteur de l'angiotensine 1/2  
 Bad: promoteur de mort associé à Bcl-2  
 Bax: protéine X associée à Bcl-2  
 BCA: acide bicinchoninique  
 Bcl-2: cellule B de lymphome 2  
 Bcl-X: cellule B de lymphome extra large  
 BK: bradykinine  
 BRCA1/2: gène de cancer du sein de type 1/2  
 CaMK: protéine kinase dépendante de  $Ca^{2+}$ /calmoduline  
 cAMP: adénosine monophosphate cyclique  
 CCR2: récepteur chimiokine C-C de type 2  
 CDK: kinase cycline dépendante  
 cGMP: guanosine monophosphate cyclique  
 CI: index de combinaison  
 COX: cyclo-oxygénase  
 CPM: carboxypeptidase M  
 CPN: carboxypeptidase N  
 CREB: protéine liant l'élément de réponse du 3',5' monophosphate  
 CXCR4: récepteur de la chimiokine C-X-C de type 4  
 CysLT1: récepteur de leucotriène cysteinyle  
 DAG: diacylglycérol  
 DAPI: 4',6'-diamidino -2-phénylindole  
 DBK: desArg<sup>9</sup>-BK  
 DISC: complexe de signalisation induisant la mort  
 DMSO: Diméthylsulfoxyde  
 DSD: échantillonnage statique double  
 D-Tat: protéine de trans-activation du VIH  
 ECA: enzyme de conversion de l'angiotensine  
 EC<sub>50</sub> : concentration efficace médiane  
 EGF: facteur de croissance épidermique  
 EGFR: récepteur du facteur de croissance épidermique  
 Elk-1: tyrosine kinase de type ETS-1  
 eNOS: NO synthase endothélial  
 EP1/2: récepteur de la prostaglandine 1  
 EpN: endopeptidase neutre 24.11

ER: récepteur de l'œstrogène  
ERK: kinase dépendante d'un signal extracellulaire  
F2RL1 (Par2): récepteur 2 activé par les protéases  
FACS: cytométrie de flux  
Facteur XII: facteur de Hageman  
FAK: kinase d'adhésion focale  
FBS: sérum fœtal bovin  
FGF: facteur de croissance des fibroblastes  
FITC: isothiocyanate de fluorescéine  
GNrH-R: récepteur de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires  
GRK: kinases de récepteurs couplés aux protéines G  
HBSS: solution saline équilibrée de Hank  
HER: récepteur du facteur de croissance épidermique humain  
HRP : peroxydase de raifort  
IC<sub>50</sub> : concentration inhibitrice médiane  
IFN (β ou γ): interféron (β ou γ)  
IHC: immunohistochimie  
Il: interleukine  
iNOS: NO synthase inductible  
IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-triphosphate  
JNK: kinase c-jun N-terminale  
KD: kallidine (équivalent de la LysBK)  
KFPM: kininogène de faible poids moléculaire  
KHPM: kininogène de haut poids moléculaire  
KNG1: gène codant pour les kininogènes  
Kp: kallibréine plasmatique  
Kt: kallibréine tissulaire  
Lamp: glycoprotéine associée à la membrane du lysosome  
LAR: antigène relié au leucocyte commun  
LC-MS/MS: chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse  
LDBK: LysdesArg<sup>9</sup>-BK  
LPS: Lipopolysaccharide  
LysBK: lysyl-bradykinine  
MAPK: protéine kinase activée par un mitogène  
MDR: transporteur associé à la résistance multidrogue  
mGluR5: récepteur 5 du glutamate  
MMP: métalloprotéase  
MRP (1-3): protéine associée au complexe de résistance multidrogue (1-3)  
MTD: dose maximale tolérée  
MTT: sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)  
NF-κB: facteur nucléaire kappa-B  
NGF: facteur de croissance neuronal  
NO: monoxyde d'azote  
OMS: organisation mondiale de la santé  
p38: protéine kinase mitogène 38  
PAF: récepteur du facteur d'activation des plaquettes

PAR-1: récepteur de la thrombine de type 1  
PBS: solution tampon phosphate saline  
CEMP : cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux porcins  
PDGF: facteur de croissance dérivé des plaquettes  
Pep-1: peptide 1  
PG: prostaglandine  
PI: phosphatidylinositol  
PI3K: kinase phosphoinositide 3  
PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
PK (A ou C): protéine kinase (A ou C)  
PL (A<sub>2</sub> ou C): phospholipase A<sub>2</sub> (A<sub>2</sub> ou C)  
PP: peptide pénétrant  
PR: récepteur de la progestérone  
PRCP : prolylcarboxypeptidase  
PTHrP: protéine apparentée à la parathormone  
PTP: protéine tyrosine phosphatase  
PVDF: Polyfluorure de vinylidène  
pVEC: protéine vasculaire endothéliale de cadhérine murine  
rB1: récepteur B1 des kinines  
rB2: récepteur B2 des kinines  
RCPG: récepteur couplé aux protéines G  
RE: réticulum endoplasmique  
RP-HPLC: chromatographie en phase liquide à haute pression à phase inversée  
RTK: récepteur tyrosine kinase  
RT-PCR: réaction en chaîne de la polymérase de transcription inverse  
S1P1: récepteur de la sphingosine phosphate  
SEM: erreur type de la moyenne  
SKK: système kalllicréine-kinine  
SNL: signal de localisation nucléaire  
Tat: transactivateur de transcription  
TEP: tomographie d'émission de positrons  
TGF- $\beta$ : facteur de transformation de croissance  $\beta$   
TNF- $\alpha$ : facteur de nécrose tumorale alpha  
TNBC: cancer du sein triple-négatif  
TNFR: récepteur du facteur de nécrose tumorale  
TP $\beta$ : récepteur du tromboxane  $\beta$   
TrkA: récepteur kinase A lié à la tropomyosine  
TXA-2: récepteur du tromboxane A-2  
VEGF: facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
VIH: virus de l'immunodéficiency humaine  
VIP: peptide vaso-intestinal  
VOH: veine ombilicale humaine  
VPAC-1: récepteur de type 1 du peptide vasoactif  
XIAP: protéine inhibitrice de l'apoptose liée à X

## PRÉAMBULE

Les récepteurs sont des protéines retrouvées principalement à la surface des cellules. La liaison spécifique d'une substance (appelée ligand) à ces récepteurs est associée à différents types d'effets cellulaires. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), constitués de sept domaines transmembranaires, représentent la plus grande famille des récepteurs membranaires. Il existe une grande variété de ligands (ex. protéines, peptides, nucléotides, lipides, acides aminés, ions, photons et molécules olfactives et gustatives) pouvant activer les RCPGs (Millar et Newton 2010). De par cette diversité de stimuli, les RCPGs régulent plusieurs processus physiologiques et constituent une cible thérapeutique très intéressante pour une panoplie de maladies notamment le cancer. Par ailleurs, plus de la moitié des médicaments utilisés présentement en clinique ciblent des RCPGs, ce qui témoigne bien de leur intérêt.

On a longtemps cru que ces récepteurs étaient situés exclusivement à la membrane plasmique des cellules et que leurs rôles étaient de transmettre des signaux intracellulaires suite à la liaison d'un ligand. De plus, leur internalisation dans les vésicules endosomales ainsi que leur dégradation subséquente dans les lysosomes étaient simplement perçues comme une façon de mettre un terme à leur activité. Or, vers la fin des années 90, une nouvelle théorie commença à émerger selon laquelle ces récepteurs ne se retrouvaient pas uniquement à la surface des membranes cellulaires mais également à l'intérieur de la cellule au niveau des membranes du système endosomal et de certains organites dont le noyau dans lequel se trouve l'information génétique. En effet, plusieurs groupes de chercheurs indépendants ont depuis démontré hors de tout doute leur présence dans différents compartiments intracellulaires et fait mention de nouvelles fonctionnalités associées à cette compartimentation.

Ce nouveau concept, décrit comme la voie de signalisation intracrine des RCPGs, ouvre un champ nouveau d'investigation pour mieux comprendre les rôles des RCPGs intracellulaires/nucléaires en pathologies humaines. Les résultats de ces recherches devraient permettre de définir ou d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées pour diverses maladies. Ce sujet de thèse s'articule dans cette optique.

# CHAPITRE 1

## *Le système kallibréines-kinines (SKK)*

Le système kallibréines-kinines (SKK) est un système protéolytique tissulaire et plasmatique responsable de la libération de peptides vasoactifs et proinflammatoires tels la bradykinine (BK) et ses dérivés. Ce système demeure complexe et comprend plusieurs composantes protéiques, dont les kallibréines tissulaire (Kt) et plasmatique (Kp), les kininogènes de haut et faible poids moléculaire (KHPM et KFPM, respectivement) qui sont les précurseurs des kinines ainsi que les récepteurs (rB1 et rB2) qui permettent aux kinines d'exercer leurs multiples fonctions.

### **1. Kallibréines**

La formation des kinines (BK et KD) à partir des précurseurs, les kininogènes, est produite par l'action de kininogénases. Ces dernières peuvent être des protéases peu spécifiques telles la trypsine, la plasmine, l'acrosine et la rénine ou encore plus spécifiques, telles les kallibréines (du grec *kallikreas*; pancréas). Les kallibréines sont des sérines protéases qui se divisent en deux principaux sous-types: la kallibréine plasmatique (Kp ou KLKB1) d'origine hépatique (60 kDa) et la kallibréine tissulaire ou glandulaire (Kt) (kallibréine-1 ou KLK-1; 22-48 kDa) présent dans de nombreux tissus tels le rein, le pancréas, les intestins, le cerveau, la rate, les glandes salivaires, les muscles squelettiques et les vaisseaux sanguins (cellules endothéliales et musculaires lisses) (Bhoola *et al.* 1992; Leeb-Lundberg *et al.* 2005).

Ces enzymes se distinguent par leur poids moléculaire, la spécificité du substrat ainsi que le produit de l'action enzymatique. Ces derniers existent sous la forme zymogénique (précurseur inactif), les prékallibréines, et deviennent actifs par l'élimination d'un segment inhibiteur (Webster 1970; Fritz *et al.* 1977).

Les prékallibréines plasmatiques sont activées par le facteur de Hageman (Facteur XII) lorsque le sang entre en contact avec des composantes de la matrice tissulaire ou autres particules

chargées négativement (Margolis 1963; Niewiarowski *et al.* 1965). L'activation des prékallitréines plasmatiques au niveau de la cellule endothéliale peut se faire indépendamment de l'activation du facteur XII et fait intervenir la prolylcarboxypeptidase (PRCP) (Regoli *et al.* 2012; Regoli et Gobeil 2016). Les principaux substrats de la Kp sont le KHPM, le facteur XII et la pro-urokinase ainsi que la Kt. La Kp hydrolyse le KHPM et libère la BK (NH<sub>2</sub>-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-COOH). La Kp est inhibée par les différentes protéases à sérine (Serpines) impliquées dans l'orchestration de la coagulation, de l'inflammation et du complément tels, l'antithrombine III, l' $\alpha$ 2-macroglobuline et le C1-inhibiteur (Cicardi et Cugno 2012).

Outre la Kp, la prékallitréine tissulaire peut être activée *in vitro* par la trypsine et la plasmine. Toutefois, *in vivo*, les protéases qui activent la prékallitréine tissulaire sont inconnues. La Kt hydrolyse le KFPM pour libérer la LysBK ou KD (NH<sub>2</sub>-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-COOH) (voir section kinines). La Kt est spécifiquement inhibée par des Serpines comme la kallistatine et l'aprotinine (Moreau *et al.* 2005).

La Kp est codée par un seul gène alors que les Kt sont codés par plusieurs gènes (3 chez l'humain mais beaucoup plus chez le rongeur). Ces gènes sont situés sur le chromosome 19q3 (Bhoola *et al.* 1992; Leeb-Lundberg *et al.* 2005).

## 2. Kininogènes

Les KHPM (88-120 kDa) et KFPM (50-68 kDa) sont des glycoprotéines synthétisées principalement par les hépatocytes et sont présents en quantité importante dans le plasma (KHPM: 90  $\mu$ g/ml; KFPM: 190  $\mu$ g/ml) (Adam *et al.* 1985; Reddigari et Kaplan 1989). D'autres organes peuvent également produire les kininogènes dont le rein, le cœur, et l'endothélium vasculaire. Les KHPM et KFPM sont codés par le même gène nommé KNG1 et sont le résultat d'un épissage alternatif (Le Corvoisier *et al.* 2000). En plus d'être précurseurs des kinines, les 2 types de kininogènes ont des propriétés anti-protéasiques et peuvent inhiber de nombreuses enzymes telles que la cathepsine, la calpaïne et la papaïne. Le KHPM peut également se lier au facteur XI, aux neutrophiles et aux plaquettes ce qui lui confère des propriétés antithrombotiques.

L'activation du SKK et la synthèse des kinines sont résumées à la Figure 1.

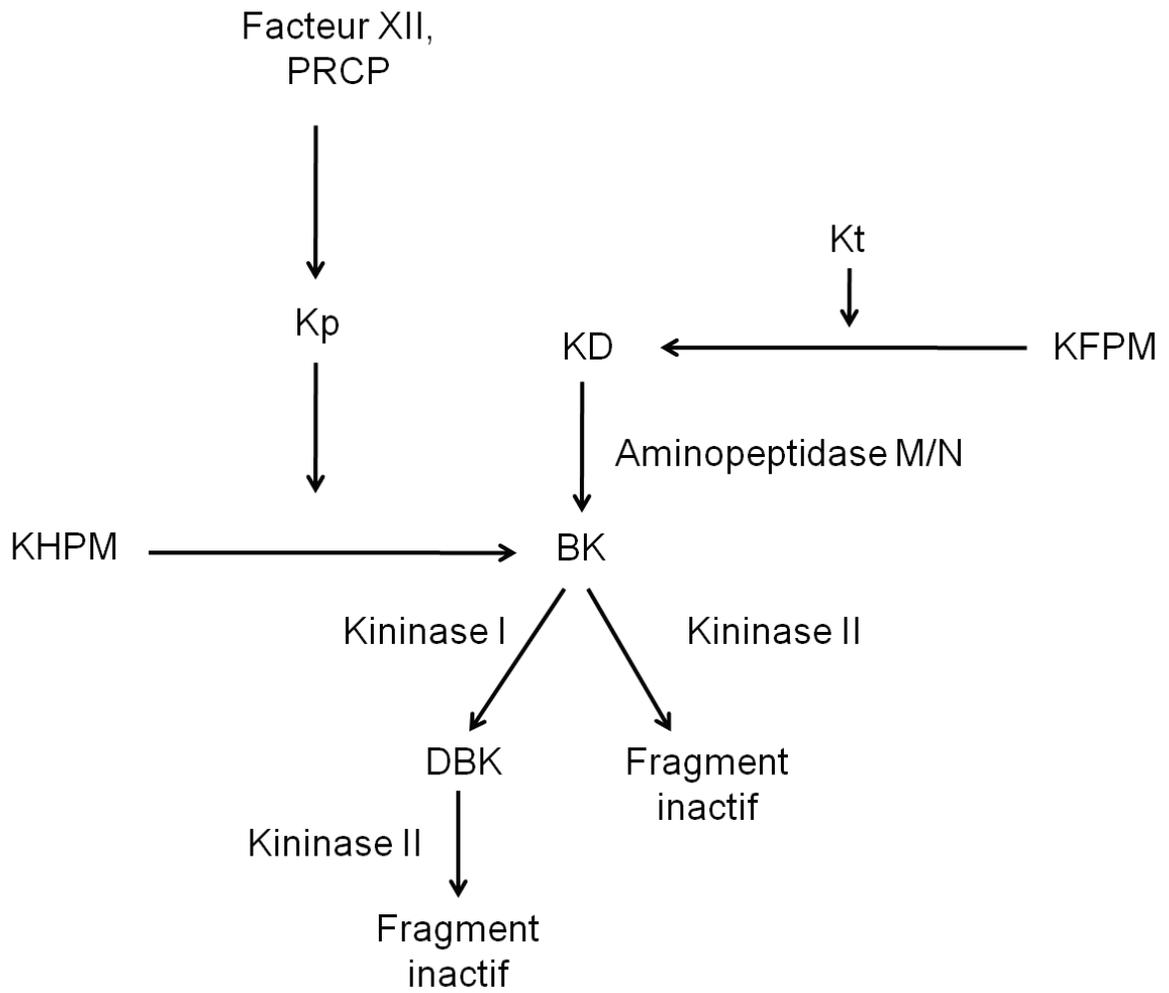


Figure 1: Le système kallibréines-kinines.

### 3. Kinines

Les kinines représentent une famille de peptides incluant la BK et LysBK (alias kallidine ou KD) et leurs métabolites actifs dépourvus de l'arginine en position carboxy terminale, la desArg<sup>9</sup>-BK (DBK) et LysdesArg<sup>9</sup>-BK (LDBK). Chez le rat, il existe une kinine spécifique nommée T-kinine (Ile-Ser-BK) en remplacement de la KD. Des variantes de la KD et de la BK ont également été trouvées chez l'humain et les primates mais non chez les rongeurs et les bovins. Ces variantes contiennent des résidus prolyl hydroxylés (*p. ex.* [Hyp<sup>3</sup>]-BK, Lys[Hyp<sup>3</sup>]-BK) et sont issues de modifications post-traductionnelles des KHPM et KFPM (Muller-Esterl 1992). Une étude récente de l'analyse protéomique du plasma/sérum humain a révélé l'existence d'une autre modification post-traductionnelle des kininogènes amenant à un isoforme de kinines contenant une phosphorylation de la sérine (*p. ex.* [pSer<sup>6</sup>]-BK) (Assis *et al.* 2015). Outre le sang et les urines, la BK est également retrouvée dans d'autres liquides corporels comme la salive et la sueur ainsi que dans plusieurs tissus tels que le cœur, les vaisseaux sanguins, le rein, le colon et le foie. Pour sa part, la LysBK est retrouvée dans le cœur, l'urine ainsi qu'en circulation. Les kinines exercent leurs activités pharmacologiques en stimulant des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG; voir section RCPG): les rB2 et rB1. La BK et la KD sont des agonistes endogènes des rB2 tandis que la DBK et la LDBK sont les agonistes préférentiels des rB1 (voir sections: rB1 et rB2).

#### 3.1 Métabolisme

Les kinines sont détruites par de nombreuses peptidases présentes dans le sang et les tissus. Ceci explique en grande partie leurs très courtes demi-vies plasmatiques (de 10 à 50 sec selon les espèces animales) (Decarie *et al.* 1996). La courte demi-vie plasmatique des kinines est en accord avec leurs modes d'action essentiellement locales (c'est-à-dire de type autacoïde) (Golias *et al.* 2007). En circulation, la BK et la KD sont métabolisées par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA, aussi appelée Kininase II) qui enlève le dipeptide en C-terminal rendant ces peptides complètement inactifs, ainsi que par les CPM et CPN, aussi appelées Kininases I, qui clivent l'arginine en C-terminale pour donner respectivement la DBK et la LDBK (toutes deux agonistes des rB1). Il a été démontré récemment que la cathepsine X, une enzyme présente à la surface des cellules endothéliales et des monocytes/macrophages, peut également jouer le rôle de

Kininase 1 (Nagler *et al.* 2009). La BK peut aussi être formée à partir de la LysBK par le clivage de la lysine en N-terminal par l'AmM (Sharma et Al-Sherif 2011). D'autres peptidases participent au métabolisme des kinines notamment l'EpN 24. 11 et l'AmP qui clivent la BK et KD pour donner lieu à des fragments inactifs (Gabra *et al.* 2003). La Figure 2 résume les activités protéolytiques de certaines peptidases sur la LysBK (agoniste rB2) et la LDBK (agoniste rB1).

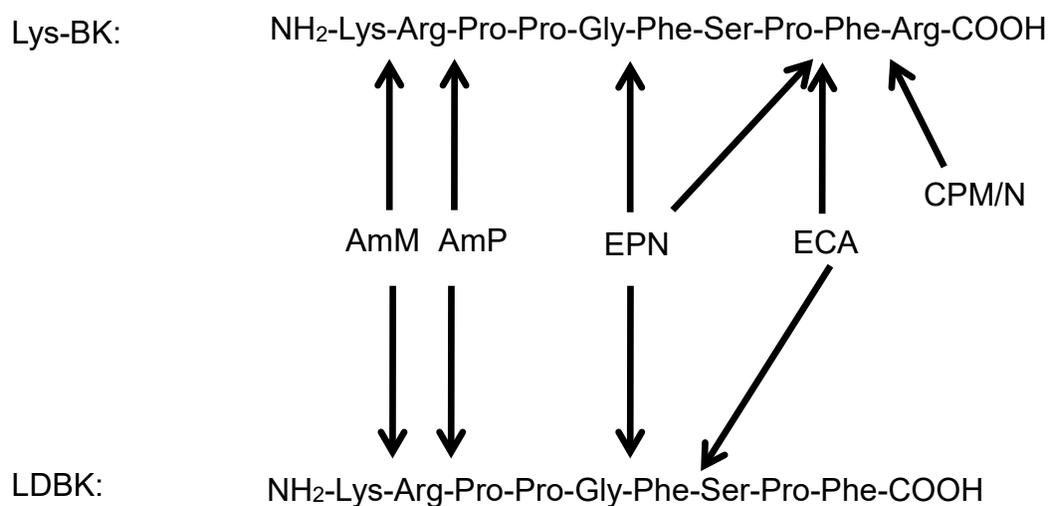


Figure 2: Métabolisme de la LysBK (agoniste B2) et LDBK (agoniste B1) par diverses peptidases (aussi appelées kininases).  
Le site de clivage du lien peptidique est indiqué par une flèche.

#### **4. Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG): les récepteurs des kinines**

Les RCPGs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui forment un immense groupe de plus de 800 récepteurs divisés en cinq grandes familles: la famille de la rhodopsine (la plus grande famille avec 701 membres), la famille de la sécrétine (15 membres), la famille des molécules d'adhésion (24 membres), la famille du glutamate (15 membres) et la famille Frizzled/goût (24 membres) (Figure 3). Les RCPGs relayent la majorité des signaux (environ 80 %) à travers la membrane et plus de la moitié des agents thérapeutiques présentement sur le marché vise un RCPG. Ces récepteurs peuvent se retrouver sous forme de monomères, de dimères ou d'oligomères et peuvent subir plusieurs modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, la phosphorylation, l'acétylation, la palmitoylation et l'ubiquitinylation (Millar et Newton 2010; Katritch *et al.* 2013).

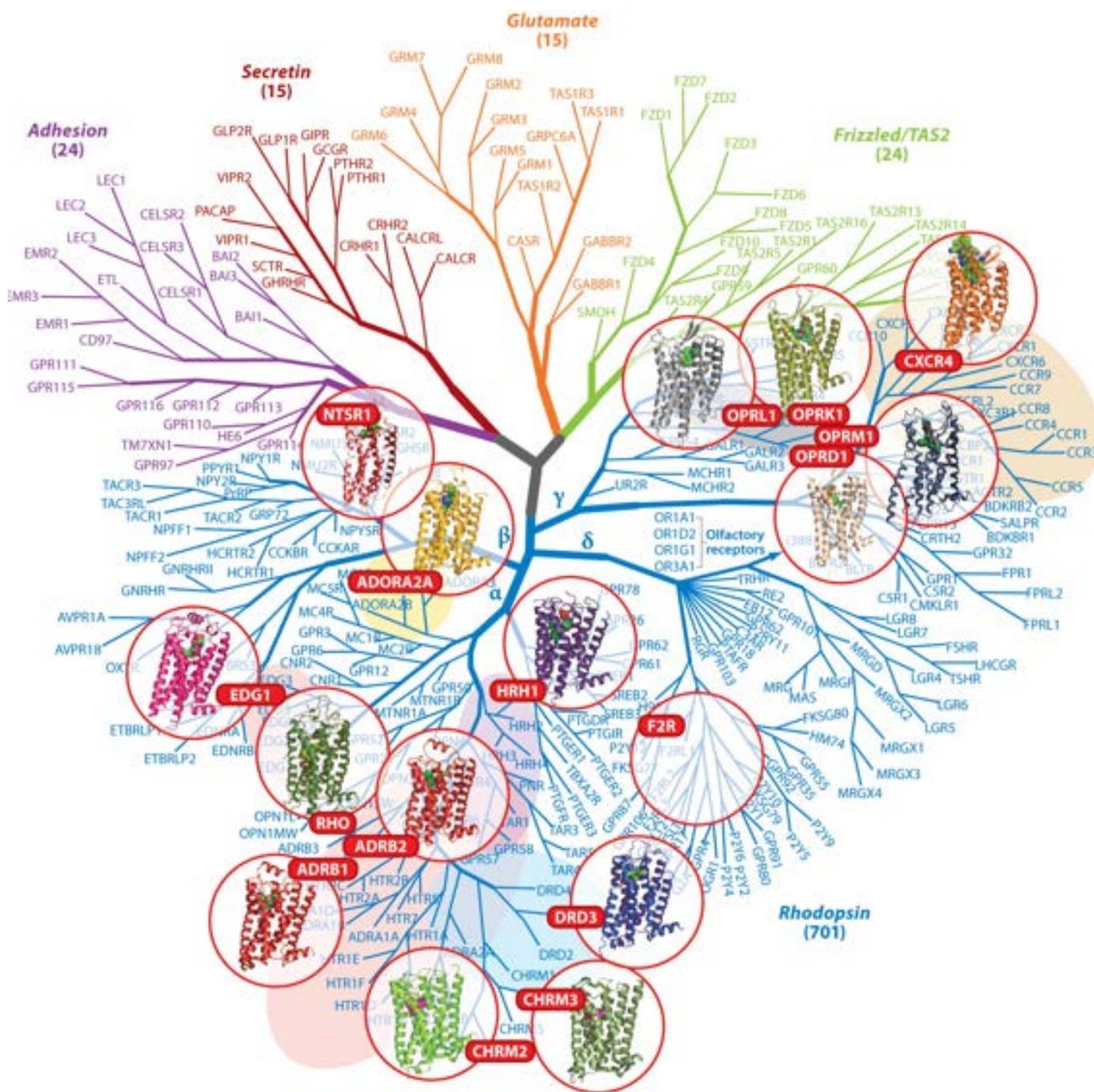


Figure 3: Classification des RCPGs.

D'après Katritch *et al.*, 2013, reproduit avec permission de l'éditeur.

Les RCPGs reconnaissent une grande variété de ligands tels que des amines cationiques, des lipides, des peptides ainsi que des protéines. Une fois liée aux RCPGs, les sous-unités  $\alpha$  des protéines G soit  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha q}$  ou  $G_{\alpha 12}$  stimulent des molécules effectrices telles que l'adénylyl cyclase (AC), la phospholipase C (PLC) ainsi que les facteurs d'échanges nucléotidiques ou GEF (pour « *guanine nucleotide exchange factor* ») de la famille Rho (Figure 4). Les RCPGs contrôlent des fonctions physiologiques clés incluant la neurotransmission, la relâche d'enzymes et d'hormones des glandes endocrines et exocrines, certaines réponses immunitaires, la contraction des muscles cardiaques et lisses ainsi que la régulation de la pression artérielle (Dorsam et Gutkind 2007). Les RCPGs sont également exprimés chez les cellules en prolifération et contribuent à l'embryogenèse, le remodelage et la réparation tissulaire, l'inflammation, l'angiogenèse ainsi que la croissance cellulaire normale et tumorale (Dorsam et Gutkind 2007).

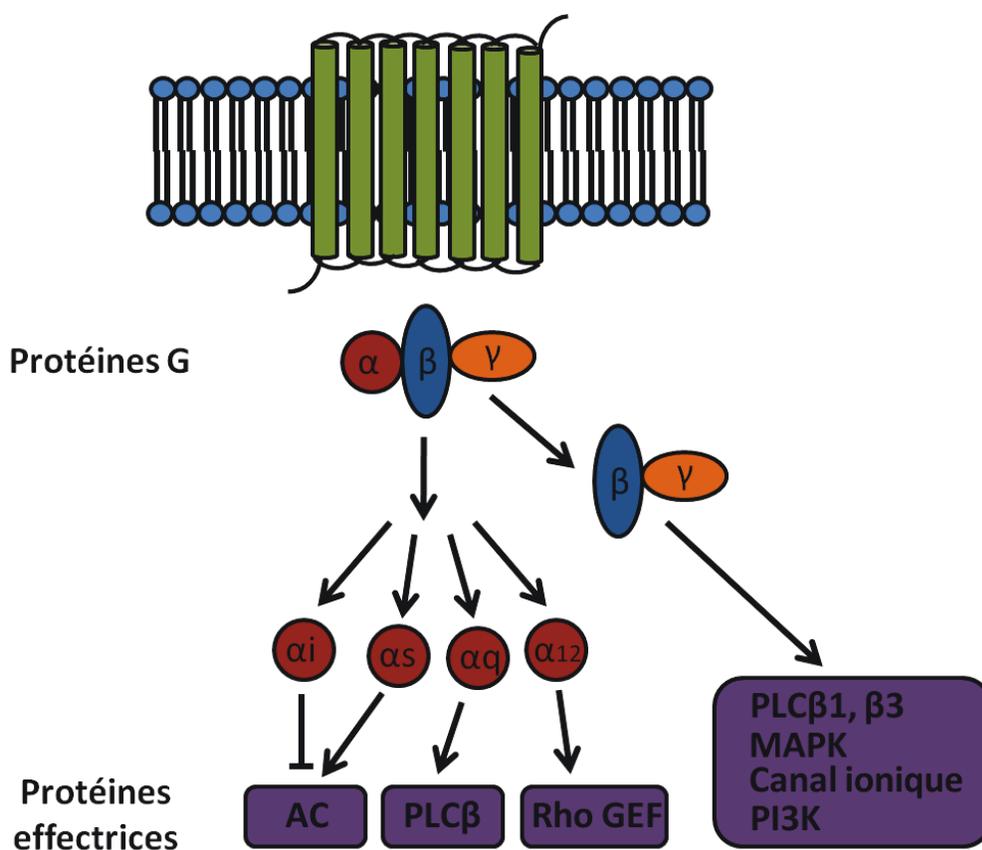


Figure 4: Réseau de signalisation des RCPGs dépendants des protéines G.

Des travaux récents indiquent que les RCPGs peuvent aussi stimuler des voies de signalisation de façon indépendante des protéines G, par exemple, l'activation de la voie des MAP kinases ERK par la  $\beta$ -arrestine plutôt que les protéines G. C'est le cas notamment du récepteur AT1 de l'angiotensine, du récepteur TP $\beta$  du TXA<sub>2</sub> ainsi que du récepteur PAR1 de la thrombine pour n'en nommer que quelques-uns (Moore *et al.* 2007; Millar et Newton 2010).

Comme nous le verrons dans ce qui suit, les récepteurs des kinines font partie de la famille des RCPGs capables d'activer plusieurs protéines G ou autres effecteurs/transducteurs, y compris les  $\beta$ -arrestines (Simaan *et al.* 2005; Kuhr *et al.* 2010; Zimmerman *et al.* 2011; Khoury *et al.* 2014b; Zhang *et al.* 2015).

Les kinines exercent leur action via deux récepteurs, B1 et B2 (rB1 et rB2). Ces récepteurs ont été identifiés pharmacologiquement à l'aide de bioessais par le groupe du Pr émérite Domenico Regoli (Université de Sherbrooke) par l'application de deux critères proposés par Schild soient l'ordre de puissance des agonistes et les affinités relatives des antagonistes (Regoli et Barabe 1980). Tel que mentionné ci-haut, les deux types des récepteurs des kinines font partie de la grande famille des RCPGs. Le rB1 possède 36 % d'homologie avec le rB2 et les gènes des deux récepteurs sont situés sur le même locus à 12 kb de distance sur le chromosome 14. L'ARNm de rB2 est de 4 kb alors que celui de rB1 est de 1,4 kb chez l'humain et possèdent chacun 3 exons (Leeb-Lundberg *et al.* 2005).

#### 4.1 rB2

rB2 comprend 364 acides aminés et possède une masse moléculaire d'environ 45 kDa. Le poids moléculaire de rB2 peut également être supérieur à la valeur théorique suivant la glycosylation de la protéine (Marceau et Regoli 2004; Leeb-Lundberg *et al.* 2005). Trois sites de glycosylation sont retrouvés dans les domaines extracellulaires et revêtent une importance au niveau du couplage efficace aux protéines G, l'oligomérisation, la dégradation du récepteur, la maturation ainsi que l'adressage intracellulaire (Leeb-Lundberg *et al.* 2005). Toutefois, la glycosylation ne semble pas affecter l'affinité du récepteur pour le ligand dans le cas du rB2 chez

le rat puisqu'il a été démontré qu'une déglycosylation ne changeait pas les affinités de la BK et de l'antagoniste HOE 140 chez ce dernier (Yaqoob *et al.* 1995). De plus, le rB2 comprend des motifs DRY et NPxxY (également retrouvés chez rB1), hautement conservés parmi les RCPGs de la rhodopsine. Ces motifs jouent plusieurs rôles importants pour la conformation des récepteurs, la liaison du ligand, le couplage aux protéines G ainsi que l'internalisation des récepteurs (Leeb-Lundberg *et al.* 2005; Rovati *et al.* 2007). La formation de ponts disulfures joue un rôle important dans l'insertion du récepteur dans la membrane pour former un site de liaison. La présence de cystéines dans la portion C-terminale donnant dans le cytosol entraîne généralement une palmitoylation ce qui peut moduler le couplage aux protéines G, l'internalisation, la resensibilisation du récepteur ainsi que l'adressage intracellulaire de ce dernier. Finalement, la phosphorylation en C-terminale par les GRK entraîne une désensibilisation des RCPGs activés et peut également affecter l'endocytose, le recyclage, l'adressage et même le couplage aux protéines G (Blaukat 2003; Fredriksson *et al.* 2003; Leeb-Lundberg *et al.* 2005).

#### 4.1.1 Régulation et désensibilisation

Le rB2 est exprimé de façon constitutive et une fois activé, il est internalisé puis recyclé rapidement à la membrane (en 30 min environ) à partir du compartiment endosomal (Blaukat *et al.* 1996; Zhou *et al.* 2000; Bachvarov *et al.* 2001). L'internalisation des rB2 a lieu par le recrutement et la liaison des  $\beta$ -arrestines aux rB2 suite à la phosphorylation des récepteurs par des GRKs. Ce processus d'endocytose semble opérer majoritairement via les puits recouverts de clathrines et non les cavéoles (Zhang *et al.* 1998; Bachvarov *et al.* 2001; Bawolak *et al.* 2011; Khoury *et al.* 2014a). Récemment, grâce à l'utilisation de protéines de fusion EGFP-rB2 et à l'évaluation de certains inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette, le groupe de Marceau a observé une colocalisation possible des rB2 avec Rab7, suggérant un routage possible du rB2 vers les lysosomes (Charest-Morin *et al.* 2013).

Enfin, l'expression de rB2 à la membrane cytoplasmique peut être modulée par des cytokines inflammatoires telles que Il-1, TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$  (Bathon *et al.* 1992; Prado *et al.* 2002; Kim *et al.* 2005; Brechter *et al.* 2008).

#### 4.1.2 Voies de signalisation

Le rB2 signale principalement via la protéine  $G_{\alpha_q}$  mais aussi par d'autres types de protéines G tels  $G_{\alpha_i}$ ,  $G_{\alpha_{12/13}}$  et  $G_{\alpha_s}$  (Leeb-Lundberg *et al.* 2005). La signalisation via  $G_{\alpha_q/11}$  entraîne une activation de la phospholipase C- $\beta$  (PLC $\beta$ ) qui entraîne à son tour la production de second messagers tels que l'IP<sub>3</sub>, le DAG ainsi que le calcium. L'élévation du niveau de calcium entraîne plusieurs effets dont l'activation des voies du NO et de cGMP, voies qui contrôlent principalement les effets dilatatoires de la BK au niveau des vaisseaux sanguins. L'augmentation du niveau de calcium entraîne également la transactivation d'EGFR tout comme l'activation de la PLC $\beta$  par  $G_{\alpha_q}$ . De plus, le calcium et le DAG activent plusieurs isoformes de la PKC (PKC  $\alpha$ ,  $\varepsilon$ ,  $\zeta$ ) qui participe à son tour à l'activation de plusieurs voies de signalisation incluant celle de la prolifération cellulaire (Leeb-Lundberg *et al.* 2005). En plus de la PLC $\beta$ , rB2 peut aussi activer les PLA<sub>2</sub> et PLD ainsi que la sphingosine kinase ce qui résulte en une élévation de la concentration de seconds messagers tels que l'acide arachidonique (convertie par la suite en prostaglandines), l'acide phosphatidique et la sphingosine-1-phosphate (Burch et Axelrod 1987; Nishizuka 1992; Blaukat *et al.* 2000; Blaukat et Dikic 2001).  $G_{\alpha_q}$  entraîne également l'activation de la voie PI3K menant ultimement à l'activation de PKC (Blaukat 2003).

Le couplage des rB2 aux protéines  $G_{\alpha_{12/13}}$  peut entraîner l'activation de petites protéines G telles que Rho, Rac ou Cdc42 et ainsi affecter l'organisation du cytosquelette d'actine, la forme de la cellule et sa motilité. L'activation de  $G_{\alpha_i}$  et  $G_{\alpha_s}$  module les niveaux d'cAMP et donc, par le fait même, l'activité de la PKA (Graness *et al.* 1998; Gohla *et al.* 1999; Blaukat *et al.* 2000; Liebmann 2001). La stimulation de  $G_{\alpha_i}$  par les récepteurs des kinines entraîne l'activation de la voie Ras/Raf (Blaukat 2003) ainsi que de la voie ERK/MAPK, tel que rapporté en 1998 par le groupe de Naraba qui a montré que rB1 et rB2 activaient ERK1 et ERK2 mais pas JNK-1 ni JNK-2 (Naraba *et al.* 1998). Lorsqu'activés, les MAPKs transloquent au noyau où elles phosphorylent et activent des facteurs de transcriptions nucléaires impliqués dans la synthèse d'ADN et la division cellulaire (van Biesen *et al.* 1996; Gutkind 1998; Leeb-Lundberg *et al.* 2005).  $G_{\alpha_i}$  joue aussi un rôle sur PI3K et donc par le fait même sur PLC et PKC (Blaukat 2003). La Figure 5 présente les principales voies activées par rB2.



### 4.1.3 *Distribution et fonctions physiologiques/pathologiques*

Les rB2 sont très largement distribués dans le corps, à la fois dans le système nerveux central et périphérique ainsi que dans les systèmes cardiovasculaire, génito-urinaire, respiratoire et neuronal (Marceau 1995; Hall 1997; Marcondes et Antunes 2005), et on les retrouve dans plusieurs tissus tels que l'utérus, l'intestin, les reins, le cœur et l'aorte (Golias *et al.* 2007). Plus précisément, les rB2 sont retrouvés chez plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales, musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules mésangiales, les neurones, les astrocytes et les neutrophiles polynucléaires (Couture *et al.* 2001).

Compte tenu de son expression ubiquiste, rB2 est responsable de la plupart des effets physiologiques des kinines (voir section sur les kinines) (Blaukat *et al.* 1996; Zhou *et al.* 2000; Bachvarov *et al.* 2001). Ainsi, au niveau physiologique, rB2 joue un rôle dans l'homéostasie vasculaire où il crée une hypotension due à une dilatation des vaisseaux, l'angiogenèse, l'excrétion rénale ainsi que la prolifération et l'apoptose. Au niveau pathologique, rB2 joue un rôle dans l'inflammation, l'ischémie, le diabète et le sepsis (Couture *et al.* 2014).

## 4.2 *rB1*

rB1 possède une séquence de 353 acides aminés et sa forme principale est de 35 kDa quoique d'autres formes de masse moléculaire plus élevée ont aussi été observées découlant de certaines modifications post-traductionnelles comme la glycosylation (Marceau et Regoli 2004; Leeb-Lundberg *et al.* 2005).

### 4.2.1 *Régulation et désensibilisation*

Le rB1 est peu ou pas exprimé en conditions normales mais est plutôt induit lors de situations pathologiques très variées comprenant les lésions traumatiques et ischémiques ainsi que dans de nombreuses maladies inflammatoires générales incluant le diabète, le sepsis, les infections les maladies cardiovasculaires, certaines maladies du système nerveux central (ex. sclérose en

plaques, Alzheimer) et le cancer (Marceau *et al.* 1998; Leeb-Lundberg *et al.* 2005; Figueroa *et al.* 2012; Couture *et al.* 2014).

Il est induit par différents facteurs de l'inflammation et pathogènes tels les endotoxines de nature lipopolysaccharidique (LPS), les cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , EGF, IL-2 et IL-8 ou encore des facteurs de croissance (Marceau *et al.* 1998). L'induction de rB1 par les cytokines est régulée par les MAPK (p38, ERK et c-Jun) ainsi que la transcription par NF- $\kappa$ B (Marceau *et al.* 1998; Leeb-Lundberg *et al.* 2005; Couture *et al.* 2014). Or, la BK stimule l'activation de NF- $\kappa$ B ce qui entraîne l'expression du gène IL-1 $\beta$  et par conséquent, l'activation de rB1 (Pan *et al.* 1996; Marceau *et al.* 1998; Schanstra *et al.* 1998; Phagoo *et al.* 1999; Xie *et al.* 2000; Leeb-Lundberg *et al.* 2005).

La DBK et la LDBK sont les ligands naturels sélectifs du rB1 (Regoli et Barabe 1980; Leeb-Lundberg *et al.* 2005). Chez les rB1 humains recombinants et naturels (ou endogènes), la LDBK montre des affinités environ 50-100 fois supérieures par rapport à celles de la DBK (Menke *et al.* 1994; Gobeil *et al.* 1996a; Austin *et al.* 1997).

Le rB1, contrairement au rB2, n'est pas désensibilisé ni internalisé suivant la liaison de son ligand (Leeb-Lundberg *et al.* 2005). Ceci s'explique par le fait que la partie C-terminale du rB1 est plus courte par rapport au rB2 et elle est dépourvue de sites de phosphorylation pour les GRK, PKC et PKA (Leeb-Lundberg *et al.* 2005). En absence de ligand, le rB1 est constitutivement internalisé via un mécanisme clathrine-dépendant contrairement à rB2 (Marceau *et al.* 1998; Leeb-Lundberg *et al.* 2005). De plus, il a été démontré que la stimulation prolongée du rB1 par son propre agoniste peut entraîner une augmentation de son expression (Prado *et al.* 2002).

#### 4.2.2 Voies de signalisation

De manière générale, les rB1 activent sensiblement les mêmes voies de signalisation que le rB2. En effet, rB1 active lui aussi G $_{\alpha q}$  et G $_{\alpha i}$  ainsi que plusieurs autres voies de signalisation aussi activée par rB2. Toutefois, il existe des différences entre l'activation des deux types de récepteurs:

alors que rB2 mène à une réponse rapide et courte, rB1 entraîne plutôt une réponse lente et soutenue. Cette différence peut être expliquée par différents mécanismes de désensibilisation et d'internalisation ainsi que par une signalisation spécifique à chacun par exemple la mobilisation d'un pool de calcium différent ou le recrutement d'eNOS/iNOS (Couture *et al.* 2014).

Chez plusieurs lignées de cancer du sein dont les cellules MDA-MB-231, les effets prolifératifs des rB1 dépendent de l'activité du récepteur de l'EGF et subséquemment de la phosphorylation des MAPK p42/p44 (Molina *et al.* 2009; Ehrenfeld 2012). Chez les cellules de muscles lisses vasculaires, la prolifération induite par l'activation des rB1 est également médiée par l'activation des MAPK via les voies des protéines G sensibles à la toxine du choléra, la PKC et la kinase Src (Christopher *et al.* 2001). Une autre étude réalisée sur les cellules de muscles lisses vasculaires a cependant démontré que le rB1 peut inhiber la prolifération induite par le PDGF en partie en prolongeant l'activation de MAPK ERK conduisant à une expression accrue de p27<sup>Kip1</sup> (Dixon *et al.* 2002). Cette dernière étude est en accord avec les résultats rapportés par le groupe de Morissette *et al.* qui a montré que la stimulation des rB1 inhibe la prolifération des cellules de muscles lisses vasculaires par des mécanismes impliquant l'activation de la PI3K mais non la relâche de prostanoides ou de NO (Morissette *et al.* 2006).

Chez les cellules de cancer de la prostate PC-3, l'activation de rB1 entraîne plutôt la prolifération/migration des cellules, processus qui se fait via l'activation de FAK (Taub *et al.* 2003). De plus, rB1 module la relâche de métalloprotéases des cellules de cancer du sein, des effets contrôlés en partie par l'activation de ERK1/2, p38 et de la transactivation de EGFR (Stuardo *et al.* 2004; Ehrenfeld *et al.* 2009; Ehrenfeld *et al.* 2011). Il est également connu que rB1 stimule la chimiotaxie chez les neutrophiles toutefois la signalisation impliquée dans ce processus n'est pas encore connue (Paegelow *et al.* 2002; Ehrenfeld *et al.* 2006).

Plus récemment, le groupe de Skidgel a démontré que la stimulation des rB1 amène à l'activation de la iNOS et production subséquente de NO dans les cellules endothéliales pulmonaires humaines préalablement sensibilisées à l'IL-1 $\beta$  (pour l'induction du rB1) (Kuhr *et al.* 2010). Cette voie d'activation de la iNOS nécessiterait une association au préalable des rB1 avec la  $\beta$ -arrestine 2 (Kuhr *et al.* 2010).

### 4.2.3 Distribution et fonctions physiologiques/pathologiques

rB1 est peu ou pas exprimé en conditions normales mais peut être induit chez plusieurs types cellulaires comme les cellules endothéliales, épithéliales, musculaires lisses, neuronales, mésangiales ainsi que les fibroblastes, les ostéoblastes et certaines cellules immunocompétentes comme les lymphocytes T et les macrophages (Goldstein et Wall 1984; Burch *et al.* 1989; D'Orleans-Juste *et al.* 1989; Tiffany et Burch 1989; Ljunggren et Lerner 1990; Bascands *et al.* 1993; Rangachari *et al.* 1993; Galizzi *et al.* 1994).

rB1 possède plusieurs fonctions biologiques. Au niveau des cellules endothéliales par exemple, il stimule la libération de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et du monoxyde d'azote (NO) qui induisent la relaxation musculaire lisse vasculaire provoquant une diminution de la résistance vasculaire périphérique (Chakir *et al.* 1996; Farmer *et al.* 1998; Marceau *et al.* 1998; McLean *et al.* 2000). Il peut également entraîner une extravasation plasmatique et une diapédèse de leucocytes au niveau des veinules post-capillaires des sites inflammatoires (Chakir *et al.* 1996; Farmer *et al.* 1998; McLean *et al.* 2000). Chez les cellules musculaires lisses, le rB1 peut engendrer de manière directe ou non une vasoconstriction (exemple chez l'aorte de lapin) ou une vasodilatation (exemple chez l'artère mésentérique de lapin) (Marceau 1995; Rizzi *et al.* 1997; McLean *et al.* 2000). Le rB1 peut également provoquer des effets myotropiques contractiles chez des cellules de muscles lisses isolés non vasculaires chez de nombreuses espèces animales (Marceau *et al.* 1980; Couture *et al.* 1981). Chez certains types de fibroblastes et muscles lisses vasculaires, le rB1 peut stimuler la division cellulaire et la libération de prostaglandines (Goldstein et Wall 1984).

rB1 joue un rôle de grande importance dans l'inflammation et la douleur chronique (Couture *et al.* 2014). Les rB1 médient une sensibilisation à la douleur de manière indirecte en stimulant la relâche d'autres médiateurs de l'inflammation (Dray et Perkins 1993; Couture *et al.* 2014).

Il est à noter que les rB1 et rB2 peuvent coexister dans les mêmes types cellulaires par exemple les cellules endothéliales, musculaires lisses, nerveuses et épithéliales, les fibroblastes ainsi que plusieurs types de cellules cancéreuses (Marceau *et al.* 1998; McLean *et al.* 2000; Figueroa *et al.* 2012).

## 5. Pharmacologie des récepteurs des kinines

### 5.1 Agonistes et antagonistes des rB2

Plusieurs agonistes et antagonistes ont été développés comme outils pharmacologiques et à des fins thérapeutiques (voir Tableau 1). La première génération d'antagonistes des rB2 était basée sur la séquence [D-Phe<sup>7</sup>]-BK mais ces antagonistes avaient une efficacité plutôt faible et faisaient preuve d'une activité intrinsèque comparable à un agoniste partiel (Stewart et Vravec 1991; Regoli *et al.* 1993). La seconde génération d'antagonistes peptidiques présente une bonne sélectivité et une meilleure stabilité *in vivo*. Un exemple prototypique de cette classe est le HOE 140 (alias Icatibant ou Firazir) qui est approuvé pour le traitement de l'angioedème héréditaire (Gougat *et al.* 2004; Stewart 2004; Moreau *et al.* 2005; Whalley *et al.* 2012; Gomis *et al.* 2013; da Costa *et al.* 2014). La troisième génération représente les antagonistes de nature non peptidique, actifs *per os* tels que le MEN16132 (Fasitibant) et le FR173657 (Whalley *et al.* 2012; da Costa *et al.* 2014) (Tableau 1).

Plusieurs agonistes sélectifs rB2 résistants au métabolisme enzymatique, ont été développés au cours des dernières années (Heitsch 2003; Marceau et Regoli 2004; Regoli *et al.* 2012). Dans cette catégorie, on retrouve le composé peptidique R523, développé par le groupe de Regoli (Drapeau *et al.* 1988; Rhaleb *et al.* 1990), et le RMP-7 (alias Cereport ou labradimil), développé par le groupe d'Alkermès inc. aux États-Unis (Emerich *et al.* 2001) (voir Tableau 1). Ces derniers se sont révélés être résistants *in vitro/in vivo* à la dégradation par l'ECA et la CPM (Drapeau *et al.* 1988; Emerich *et al.* 2001; Gobeil *et al.* 2002; Savard *et al.* 2013). Notre laboratoire a récemment développé un nouvel agoniste rB2 nommé NG291 comportant différents acides aminés non-naturels (Bélanger *et al.* 2009; Côté *et al.* 2010; Savard *et al.* 2013). Cet agoniste possède une stabilité totale contre l'ECA et est de 20 à 200 fois plus puissant *in vitro* que le RMP-7 et le R523, respectivement, sur le rB2 humain (Bélanger *et al.* 2009). Lorsqu'administré par voie intraveineuse chez les animaux, le NG291 exerce des effets hypotenseurs, antithrombotiques et profibrinolytiques plus marqués vis-à-vis la BK (Savard *et al.* 2013). Des études précliniques récentes ont montré que le NG291 peut exercer des effets cardioprotecteurs après infarctus du myocarde (Manolis *et al.* 2010; Potier *et al.* 2013; Desposito *et al.* 2015) et des effets néo-

angiogéniques notables dans l'ischémie critique des membres inférieurs chez la souris (Desposito *et al.* 2015).

Plusieurs études incluant les nôtres ont montré la capacité de ces agonistes rB2 à accroître l'acheminement transvasculaire vers le cerveau et l'efficacité d'agents diagnostiques et anticancéreux pour la détection et la thérapie des tumeurs cérébrales malignes (Emerich *et al.* 2001; Côté *et al.* 2010; Côté *et al.* 2012; Côté *et al.* 2013).

## 5.2 Agonistes et antagonistes des rB1

Le rôle potentiel des antagonistes rB1 dans le traitement de l'inflammation et de la douleur chronique a été clairement démontré dans de nombreux modèles précliniques (Leeb-Lundberg *et al.* 2005; Whalley *et al.* 2012; Couture *et al.* 2014). Les premiers antagonistes des rB1 furent développés par le groupe de Regoli en 1977 en substituant la phénylalanine en position 8 de la DBK et LDBK par un acide aminé aliphatique hydrophobe telle la leucine, pour former les peptides [Leu<sup>8</sup>]DBK et Lys[Leu<sup>8</sup>]DBK, respectivement. Ces derniers exercent une action antagoniste compétitive et sélective chez les rB1 exprimés au niveau de l'aorte de lapin (Regoli *et al.* 1977; Drouin *et al.* 1979a; Drouin *et al.* 1979b). Leur forte sensibilité au métabolisme enzymatique par de multiples peptidases (ECA, NEP 24.11, AmM et AmP) ainsi que leur activité agoniste partielle, en particulier chez la souris, sont des facteurs limitants à leur utilisation lors d'études *in vivo* chez les animaux (Gobeil *et al.* 1996b; Regoli *et al.* 1998; Gobeil *et al.* 1999).

Parmi les antagonistes rB1 peptidiques de seconde génération, on retrouve le R715 et le R954, tous deux développés dans nos laboratoires, ainsi que le peptide B9430, développé par le groupe de Stewart (voir Tableau 1 pour séquences peptidiques). Le peptide B9430 a la particularité d'être un antagoniste mixte ou ambivalent c.a.d. capable de bloquer les deux types de récepteurs des kinines (Stewart *et al.* 1996; Gobeil *et al.* 1997; Marceau *et al.* 1998; Stewart 2004). Le peptide R954 est le seul antagoniste décrit à ce jour présentant une résistance quasi totale à la dégradation enzymatique induite par l'ECA, la NEP, l'AmM/N et l'AmP tout en possédant une très haute affinité et une excellente sélectivité pour les rB1 exprimés chez différentes espèces animales incluant l'homme (Neugebauer *et al.* 2002; Gobeil *et al.* 2014). L'antagoniste R954 s'est

avéré particulièrement utile pour l'identification des rôles physiopathologiques des rB1 avec plus d'une vingtaine de publications listées dans PubMed (Gobeil *et al.* 2014). Ce même composé a d'ailleurs été breveté et a reçu l'approbation de Santé Canada pour des essais cliniques de phase 1 à titre de nouvel agent anti-inflammatoire et analgésique pour traiter certaines complications du diabète (Gobeil *et al.* 2014). Finalement, la troisième génération présente des antagonistes non peptidiques possédant une bonne biodisponibilité orale. Cette génération inclut le SSR240612 un composé actif par voie orale et qui montre une forte activité analgésique et anti-inflammatoire dans de nombreux modèles animaux notamment de diabète (Gougat *et al.* 2004; Whalley *et al.* 2012; Couture *et al.* 2014). Les antagonistes non peptidiques des rB1 peuvent être majoritairement classés en deux grandes catégories: les sulfonamides et les carboxamides (Barth *et al.* 2012; Bozo *et al.* 2012; Whalley *et al.* 2012).

Les agonistes rB1 synthétiques présentent eux aussi un intérêt particulier puisque de nombreuses études ont démontré leur utilité thérapeutique potentielle dans les maladies cardiovasculaires ischémiques associées ou non au diabète (comme agents cardioprotecteur et proangiogénique), les maladies neurologiques (sclérose en plaques) et le cancer du cerveau (comme agent adjuvant à la chimiothérapie) (Marceau et Regoli 2004; Côté *et al.* 2009; Alhenc-Gelas *et al.* 2011; Regoli *et al.* 2012; Desposito *et al.* 2015; Savard *et al.* 2016). L'agoniste peptidique R838 a été développé par le groupe de Regoli dans le but d'obtenir un composé comportant une puissance et une résistance accrue à la dégradation enzymatique et pouvant être utilisé pour des études *in vivo* chez l'animal (Rhaleb *et al.* 1990; Drapeau *et al.* 1991). Le NG29 est un agoniste biostable, de très haute affinité pour les rB1 humains (de l'ordre du picomolaire) qui s'est montré efficace pour ouvrir transitoirement la barrière hématoencéphalique et ainsi accroître l'acheminement d'agents diagnostiques et chimiothérapeutiques pour la détection et la thérapie des tumeurs cérébrales malignes (Côté *et al.* 2009; Côté *et al.* 2012; Côté *et al.* 2013) Contrairement aux agonistes rB2 synthétiques, l'agoniste rB1 NG29 offre l'avantage de causer peu (ou pas) d'effets secondaires suite à son administration systémique tout en provoquant une ouverture de la barrière hématotumorale de plus longue durée (c.a.d 2 heures vs environ 20 min pour les agonistes rB2) (Côté *et al.* 2012). De plus, ce même agoniste a montré un bon profil d'innocuité (MTD > 75 mg/kg) ainsi qu'un profil pharmacocinétique favorable lorsqu'administré par voie intraveineuse chez le rat (Savard *et al.* 2016).

**Tableau 1: Principaux agonistes et antagonistes synthétiques des rB1 et rB2 des kinines**

Nom de code	Type	Structure	Sélectivité	Références
<b>R838</b>	Agoniste	Sar[D <sup>8</sup> Phe <sup>8</sup> ]-DBK	B1	(Rhaleb <i>et al.</i> 1990), (Cardoso <i>et al.</i> 2004)
<b>NG29</b>	Agoniste	SarLys[D <sup>8</sup> Phe <sup>8</sup> ]-DBK	B1	(Côté 2007; Côté <i>et al.</i> 2009; Côté <i>et al.</i> 2012; Savard <i>et al.</i> 2016)
<b>[Leu<sup>8</sup>]-DBK</b>	Antagoniste	[Leu <sup>8</sup> ]-DBK	B1	(Regoli et Barabe 1980)
<b>Lys[Leu<sup>8</sup>]-DBK</b>	Antagoniste	Lys[Leu <sup>8</sup> ]-DBK	B1	(Regoli et Barabe 1980)
<b>R715</b>	Antagoniste	AcLys[D <sup>β</sup> NaI <sup>7</sup> , Ile <sup>8</sup> ]-DBK	B1	(Gobeil <i>et al.</i> 1996b)
<b>R954</b>	Antagoniste	AcOrn[Oic <sup>2</sup> , (αMe)Phe <sup>5</sup> , D <sup>β</sup> NaI <sup>7</sup> , Ile <sup>8</sup> ]-DBK	B1	(Filteau 1999; Neugebauer <i>et al.</i> 2002; Gobeil <i>et al.</i> 2014)
<b>B9430</b>	Antagoniste	DArg[Hyp <sup>3</sup> , Igl <sup>5</sup> , DIgl <sup>7</sup> , Oic <sup>8</sup> ]-BK	B1/B2	(Stewart <i>et al.</i> 1996; Gobeil <i>et al.</i> 1997)
<b>SSR240612</b>	Antagoniste	[(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-3-propanoyl)amino)-3-(4-phenyl)-N-isopropyl-Nmethylpropanamide Hydrochloride]	B1	(Gougat <i>et al.</i> 2004; Bélanger <i>et al.</i> 2009)
<b>R523</b>	Agoniste	[Phe <sup>8</sup> ψ(CH <sub>2</sub> NH)Arg <sup>9</sup> ]-BK	B2	(Drapeau <i>et al.</i> 1988; Côté <i>et al.</i> 2010)
<b>RMP-7(cereport, labradimil)</b>	Agoniste	[Hyp <sup>3</sup> , Thi <sup>5</sup> , 4-Me-Tyr <sup>8</sup> ψ(CH <sub>2</sub> NH)Arg <sup>9</sup> ]-BK	B2	(Inamura et Black 1994; Sanovich <i>et al.</i> 1995)
<b>NG291</b>	Agoniste	[Hyp <sup>3</sup> , Thi <sup>5</sup> , NChg <sup>7</sup> , Thi <sup>8</sup> ]-BK	B2	(Bélanger 2008; Bélanger <i>et al.</i> 2009; Savard <i>et al.</i> 2013)
<b>[D<sup>8</sup>Phe<sup>7</sup>]-BK</b>	Antagoniste	[D <sup>8</sup> Phe <sup>7</sup> ]-BK	B2	(Stewart et Vravek 1991)
<b>HOE 140</b>	Antagoniste	DArg[Hyp <sup>3</sup> , Thi <sup>5</sup> , DTic <sup>7</sup> , Oic <sup>8</sup> ]-BK	B2	(Hock <i>et al.</i> 1991; Rhaleb <i>et al.</i> 1992)
<b>(Icatibant, Firazir)</b>	Antagoniste	(E)-3-(6-acetamido-3-pyridyl)-N-[N-[2,4-dichloro-3-[(2-methyl-8-quinolinyloxy)methyl]phenyl]-N-methylamino carbonylmethyl]acrylamide	B2	(Inamura <i>et al.</i> 1997; Gobeil <i>et al.</i> 1999)
<b>FR173657</b>	Antagoniste	(E)-3-(6-acetamido-3-pyridyl)-N-[N-[2,4-dichloro-3-[(2-methyl-8-quinolinyloxy)methyl]phenyl]-N-methylamino carbonylmethyl]acrylamide	B2	(Inamura <i>et al.</i> 1997; Gobeil <i>et al.</i> 1999)
<b>MEN16132</b>	Antagoniste	4-(S)-amino-5-(4-piperazino)-5-oxopentyl(trimethyl)ammonium chloride hydrochloride	B2	(Valenti <i>et al.</i> 2005)

## 6. Kinines et cancers

Les kinines produites par le SKK interviennent dans plusieurs processus de la tumorigenèse et de la progression tumorale notamment dans la prolifération, la migration, l'invasion et la dissémination (métastases) des cellules cancéreuses. La néoangiogenèse ainsi que l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par les kinines peuvent aussi contribuer au développement tumoral (Sharma et Al-Sherif 2011; Figueroa *et al.* 2012; da Costa *et al.* 2014).

La Kt KLK1 joue un rôle dans la croissance et l'invasion tumorale de plusieurs types de cancers et sa présence est indicative d'un mauvais pronostic (Dlamini et Bhoola 2005a; Dlamini et Bhoola 2005b; Dominek *et al.* 2010; Avgeris *et al.* 2012). Certaines cellules cancéreuses utilisent les kinines comme facteurs de communication paracrines pour stimuler leur croissance via l'activation de leurs récepteurs situés sur les cellules du stroma tumoral (ex. macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales). Cette signalisation paracrine des kinines est connue sous le nom d'effet de proximité (ou «*bystander effect*») (voir revues de Figueroa *et al.* 2012 ; da Costa *et al.* 2014).

Il a été démontré que la BK peut induire la néoangiogenèse tumorale par deux mécanismes différents. Dans la phase précoce, la BK augmente l'hyperperméabilité de la vascularisation tumorale via les récepteurs B2 situés sur les cellules endothéliales alors que dans la phase tardive elle induit l'expression de VEGF dans les fibroblastes du stroma qui induisent à leur tour l'angiogenèse et ainsi la croissance tumorale (Senger *et al.* 1986; Papapetropoulos *et al.* 1997; Ishihara *et al.* 2002). De plus, les kinines augmentent le flux sanguin (par la vasodilatation) ce qui favorise l'apport de nutriments et d'oxygène à la tumeur (Plendl *et al.* 2000).

Une étude récente digne de mention réalisée par le groupe de Guevara-Lora, a révélé la capacité des cellules de glioblastome U-373 à produire le KHPM, la Kt, des kinines et autres agents de manière endogène (Guevara-Lora *et al.* 2013). L'ensemble de ce travail suggère que les cellules U-373 expriment un système générateur de kinines pouvant agir de manière autocrine, voire même intracrine, bien que ce dernier aspect n'a pas été étudié (voir chapitre 2, section 1).

En plus d'une surexpression des composantes nécessaires à la génération des kinines, plusieurs types de cancers surexpriment un ou les deux types de récepteurs (rB1 et rB2) (voir revue de Figueroa *et al.* 2012). En effet, plusieurs études *in vitro* sur cellules cancéreuses en culture et études immunohistologiques sur biopsies cliniques ont illustré la présence (ARNm et protéines) et un rôle possible des récepteurs des kinines dans de nombreux types de cancers, dont le cancer du rein (Wang *et al.* 1996; Moodley *et al.* 2005), de l'œsophage (Dlamini et Bhoola 2005a; Dlamini et Bhoola 2005b), de l'utérus (Olejek *et al.* 2002), de la vessie (Toledo 2012), de la peau (Fujita *et al.* 2009), mésothéliome (Chee *et al.* 2007), de la prostate (Barki-Harrington et Daaka 2001; Wright *et al.* 2008), du poumon (Chee *et al.* 2008), du cerveau (Raidoo *et al.* 1999; Côté *et al.* 2012) ainsi que du sein (Esseghir *et al.* 2006; Wright *et al.* 2008; Molina *et al.* 2009). En général, l'activation des rB1 et rB2 chez les cellules cancéreuses stimule la prolifération, la migration et la relâche d'enzymes lytiques, notamment les MMPs, facteurs de croissance et cytokines de ces cellules (Baba et Yamaguchi 2001; Montana et Sontheimer 2011; Côté *et al.* 2012; Figueroa *et al.* 2012). Toutefois, une diminution de la croissance cellulaire et de la formation de métastases a également été observée chez des mélanomes en réponse à la stimulation des rB1 par un agoniste (Dillenburg-Pilla *et al.* 2013). Les effets des kinines ne sont donc pas constants dans tous les types de cancers.

### 6.1 Cancer du cerveau

Une corrélation entre le niveau d'expression de rB2 et l'agressivité (grade) des gliomes a été établie par le groupe de Zhao (Zhao *et al.* 2005). Nos travaux antérieurs ainsi que d'autres ont montré que les rB1 sont surexprimés dans les différents grades de gliomes (grades II, III et IV de l'OMS) en comparaison aux tissus cérébraux normaux chez l'adulte (Raidoo *et al.* 1999; Fortier *et al.* 2006; Côté *et al.* 2012). De récentes données *in vitro* suggèrent que l'activation des rB1 par un agoniste exogène stimule la migration et l'invasion des cellules de gliomes de rat C6 et des gliomes humains U251 (Lu *et al.* 2010). D'autres études *in vitro* récentes ont montré que la BK exogène peut stimuler l'invasion de cellules de gliomes U251 par un mécanisme dépendant des rB2 (Montana et Sontheimer 2011; Seifert et Sontheimer 2014). De plus, les effets prolifératifs induits par la DBK et la BK chez les cellules de gliomes humains U-138MG et U-251MG sont probablement associées à l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et ERK 1/2 (Nicoletti *et al.* 2014). La transposition *in vivo* de l'ensemble de ces observations chez l'animal reste cependant

à démontrer. Dans ce contexte, des études *in vivo* chez les animaux porteurs de tumeurs cérébrales ont montré que l'administration exogène d'agonistes rB1 et rB2 synthétiques n'interfère pas avec la progression tumorale et le temps de survie des animaux (Emerich *et al.* 2001; Côté *et al.* 2012). L'importance des récepteurs des kinines dans la biologie des cancers cérébraux *in vivo* reste donc à démontrer.

### 6.2 Cancer de la prostate

Il a été démontré que la stimulation des rB1 et rB2 par des agonistes sélectifs stimule la prolifération, la migration et l'invasion des cellules PC-3, une lignée tumorale humaine de cancer de la prostate androgène-indépendant (Barki-Harrington et Daaka 2001; Barki-Harrington *et al.* 2003; Taub *et al.* 2003). Les effets médiés par l'activation des rB1 chez les cellules PC3 peuvent être inhibés par l'antagoniste [Leu<sup>8</sup>]DBK (Taub *et al.* 2003). Une étude récente a montré que les agonistes rB1 et non ceux des rB2 peuvent stimuler la prolifération et la migration des cellules DU-145, une autre lignée humaine de cancer de la prostate androgène-indépendante (Naidu *et al.* 2014). On a également révélé une expression élevée des rB1 par immunohistochimie (IHC) dans les échantillons de tissus de prostate humains contenant des lésions de néoplasies intraépithéliales prostatiques pré-invasives ainsi que dans des biopsies de tumeurs malignes prostatiques humaines (Taub *et al.* 2003). Par ailleurs, certains antagonistes rB1/rB2 (B9870 (CU201) et BKM-570) ont montré des activités anticancéreuses *in vivo* chez les souris Nu/nu athymiques implantées avec des cellules PC3 (Stewart *et al.* 2002a; Stewart *et al.* 2002b). Sur la base des considérations précédentes, on peut donc considérer le rB1 comme une cible pharmacologique de choix pour la thérapie ciblée impliquant des antagonistes spécifiques pour ces récepteurs.

### 6.3 Cancer du sein

Cette section est volontairement plus longue que les autres puisqu'elle traite de la problématique de l'étude. Le cancer du sein est le type de cancer le plus diagnostiqué chez les femmes en Amérique du Nord et demeure une des causes les plus fréquentes de décès dans le monde entier (Jemal *et al.* 2011). Au Canada, il représente la 2<sup>e</sup> cause de mortalité en importance

et on estime qu'en 2015, 25 000 femmes recevront un diagnostic de cancer du sein. Le cancer du sein représente 26 % de tous les cancers diagnostiqués chez les femmes et 14 % de toutes les morts reliées au cancer. Il est estimé qu'une femme sur neuf aura le cancer du sein au cours de sa vie et qu'une sur trente en mourra. Le cancer du sein ne touche pas seulement les femmes et il est estimé qu'en 2015, 220 hommes auront un cancer du sein et de ce nombre 65 en mourront. Le taux de survie après 5 ans pour les femmes est de 88 % alors qu'il est de 80 % pour les hommes ([www.cancer.ca](http://www.cancer.ca)).

L'incidence de cancer du sein a augmenté jusqu'au début des années 90 pour se stabiliser puis commencer à redescendre au début des années 2000. Cette augmentation de l'incidence est attribuée à l'augmentation du dépistage par mammographie qui a permis de détecter plus fréquemment ce type de cancer. Une autre raison de cette augmentation est possiblement l'utilisation d'hormones de remplacement chez les femmes en ménopause, car la diminution remarquée de cancer du sein au début des années 2000 coïncide avec une baisse soudaine de l'utilisation de ces hormones de remplacement. Le taux de mortalité est également en constante diminution depuis le milieu des années 80 ce qui est en grande partie dû à l'augmentation du dépistage précoce ainsi qu'à l'amélioration des traitements ([www.cancer.ca](http://www.cancer.ca)).

Le cancer du sein est classé en 5 stades selon une évaluation de la grosseur et de l'invasion des tissus par la tumeur et en 3 grades selon une évaluation histologique des cellules tumorales. Les traitements présentement disponibles contre le cancer du sein sont l'hormonothérapie, la chimiothérapie, la radiothérapie ainsi que la chirurgie qui sont souvent utilisées en combinaison dans le but d'éradiquer complètement la tumeur.

Il existe plusieurs types de cancer du sein dont l'adénocarcinome est le plus courant. Il est d'origine glandulaire alors que le sarcome pour sa part est moins fréquent et origine du tissu conjonctif. La majorité des cancers du sein proviennent des cellules qui tapissent les canaux des glandes aux mamelons et porte alors le nom d'adénocarcinome canalaire. Le cancer peut aussi se former dans les cellules des glandes productrices de lait et porte alors le nom d'adénocarcinome lobulaire. Les adénocarcinomes canaux et lobulaires peuvent ensuite être classés selon qu'ils sont infiltrants (se propage) ou non.

Le carcinome canalaire invasif est le plus répandu et représente 65 à 85 % des cas de cancer du sein alors que la forme la plus agressive nommée triple-négative en référence au fait qu'elle n'exprime pas les récepteurs de l'œstrogène, de la progestérone, ni de HER2 représente pour sa part 10 à 20 % des cas diagnostiqués et le taux de survie après cinq ans demeure en dessous de 30 % (Dent *et al.* 2007; Lehmann *et al.* 2011; Boyle 2012). Les cancers du sein de type basal pour leur part représentent environ 15 % des cancers du sein diagnostiqués.

### 6.3.1 Cancer du sein triple-négatif

Le cancer du sein triple-négatif (TNBC) représente environ 15-20% des cancers du sein diagnostiqués et est plus susceptible d'affecter les jeunes, les Afro-Américaines, les Hispaniques et/ou celles porteuses de la mutation du gène BRCA1. TNBC est la forme de cancer du sein la plus agressive et a une forte tendance à développer une récurrence locale ou des métastases à distance dans d'autres organes principalement les poumons, les os, le foie, le cerveau et les ganglions lymphatiques, ce qui est susceptible d'entraîner la mort de la patiente. En fait, les métastases sont responsables de 90 % des décès liés aux TNBCs. Les TNBCs forment un groupe très hétérogène d'un point de vue immunohistochimique et sont nommés ainsi du fait qu'ils n'expriment pas les récepteurs à œstrogènes, à progestérones ni les HER2/neu rendant toute forme d'hormonothérapie impossible pour ce type de cancer. Ce sont généralement des carcinomes canauxaires mais peuvent également être d'autres types de carcinomes plus rares comme médullaire, métaplasique, cystique un encore apocrine. Les TNBCs présentent un fort degré de pléomorphisme nucléaire, une absence de formation de tubule et un haut taux de mitose.

Les TNBCs sont divisés en 3 sous-types : luminal, mésenchymateux et basal basé sur l'expression de marqueurs moléculaires. Ainsi, le type luminal exprime des gènes impliqués dans la signalisation des récepteurs androgènes alors que le type mésenchymateux exprime plutôt des gènes associés à la transition épithéliale mésenchymale et possède une prolifération plus faible. Le type basal pour sa part exprime des gènes reliés à la prolifération et impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN.

En l'absence de cibles moléculaires bien définies, la chimiothérapie cytotoxique (par exemple les anthracyclines (ex. doxorubicine), les taxanes (ex. paclitaxel) et les platines (ex. carboplatine, cisplatine) est la seule option disponible pour les patients atteints de TNBCs avancés ou métastatiques.

Malheureusement, les traitements utilisés en clinique présentement sont inefficaces contre les TNBCs notamment de sous-type basal (Palma *et al.* 2015). Une meilleure compréhension de la biologie de ce type de cancer du sein pourrait servir de base à l'élaboration de nouvelles stratégies visant à améliorer l'efficacité des traitements.

Les rôles des récepteurs des kinines et plus particulièrement des rB1 dans les cancers du sein, commencent seulement à être élucidés. Plusieurs études *in vitro* réalisées chez différentes lignées humaines de cancer du sein ont montré que la stimulation des rB1 avec un agoniste entraîne une augmentation de la prolifération (Taub *et al.* 2003; Greco *et al.* 2004; Greco *et al.* 2005; Gera *et al.* 2008; Ehrenfeld *et al.* 2009; Molina *et al.* 2009; Ehrenfeld *et al.* 2011). L'antagoniste mixte rB1/rB2, le B-9870 (CU201), inhibe la prolifération des cellules MDA-MB 231 par un mécanisme d'agoniste biaisé (Chan *et al.* 2002; Morissette *et al.* 2007). En effet, B-9870 agit comme un agoniste biaisé en inhibant l'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire causée par les récepteurs couplés à  $G\alpha_q$  en plus d'activer les voies  $G\alpha_{12,13}$ , et stimuler l'action de JNK menant ultimement à l'apoptose via la caspase-3 (Chan *et al.* 2002). Des études cliniques ont montré que des patientes atteintes de cancer du sein présentaient des niveaux plus élevés de BK et de DBK dans le sang et que ces niveaux de DBK diminuaient après résection de la tumeur (Villanueva *et al.* 2006; Van Winden *et al.* 2009). Le groupe d'Esseghir pour sa part a identifié 2 biomarqueurs potentiellement prédictifs d'un bon pronostic soit le rB1 et le TEGT ainsi qu'un autre facteur de mauvais pronostic soit le CD98hc (Esseghir *et al.* 2006). Le groupe d'Ehrenfeld a montré que la stimulation des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 avec l'agoniste sélectif LDBK induit la sécrétion de MMP-2 et MMP-9 et mène à l'activation des MAPK ERK 1/2 via un mécanisme de transactivation du récepteur EGFR (Ehrenfeld *et al.* 2011). Le même groupe a récemment démontré que les cellules tumorales de sein MCF-7, ZR-75-1 et T47D (sensibles aux œstrogènes) ainsi que les cellules MDA-MB-231 (insensible aux œstrogènes) expriment tous la Kt, KLK1, les kininogènes et les rB1 (Ehrenfeld *et al.* 2014). L'ensemble de ces travaux supporte un rôle du SKK dans le cancer du sein.

## CHAPITRE 2

# *Signalisation intracrine et Récepteurs couplés aux protéines G nucléaires*

### 1. Théorie de l'action intracrine

C'est en 1984 que le groupe de Re proposa la théorie de l'action intracrine de peptides, spécifiquement l'angiotensine II après avoir détecté la présence de sites de liaison dans les noyaux isolés d'hépatocytes de rats (Re et Bryan 1984). L'intracrinologie se définit comme un mode de signalisation cellulaire impliquant des facteurs ou messagers chimiques qui agissent à l'intérieur même de la cellule où ils ont été synthétisés et non à travers des récepteurs situés à la surface de la cellule (Figure 6). Ces facteurs intracrines possèdent une grande diversité structurale et incluent des hormones (ex. endothéline, insuline, TRH et LHRH), des facteurs de croissance (ex. PDGF, FGF et VEGF) et des enzymes (Re et Cook 2006; Re et Cook 2008; Re 2011; Re et Cook 2015). Il est à noter que certains facteurs tels que la PTHrP, le FGF ainsi que le PDGF peuvent utiliser à la fois un mode d'action intracellulaire et extracellulaire (paracrine/endocrine). Comme nous le verrons plus loin, certains facteurs intracrines exercent à la fois des effets intracellulaires et cellulaires (par l'entremise de récepteurs de surface) pouvant être biologiquement semblables ou différents. Par exemple, il a été démontré dans un modèle de surexpression que la PTHrP sécrétée exerce des effets anti-mitogéniques à la membrane cellulaire, alors que sa rétention intracellulaire et sa translocation au noyau, provoquent des effets mitogéniques chez la lignée de muscle lisse vasculaire A-10 (Massfelder *et al.* 1997; Watson *et al.* 2000). Le mécanisme d'action intracellulaire de la PTHrP demeure toutefois un mystère. Comme autre exemple, on peut citer plus récemment, en 2007, les travaux du groupe de Goetzl qui ont démontré que la S1P pouvait avoir des effets opposés sur la prolifération des lymphocytes T suivant l'activation de son récepteur situé à la membrane plasmique ou nucléaire (Liao *et al.* 2007).

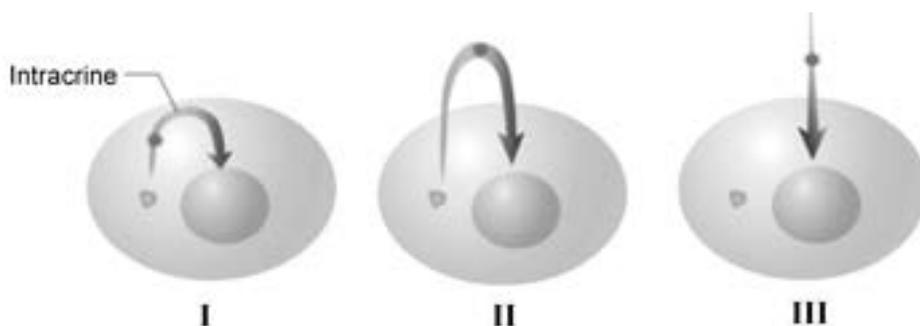


Figure 6: Différents modes d'action intracrine.

(I) Un facteur intracrine peut avoir une action à l'intérieur même de la cellule où il a été synthétisé, (II) un facteur intracrine peut avoir une action à l'intérieur de la cellule où il a été synthétisé suite à sa sécrétion et sa recapture, et (III) un facteur intracrine peut être synthétisé par une cellule, sécrété puis internalisé par une autre cellule. D'après Re et Cook (2009), reproduit avec permission de l'éditeur.

L'intracrinologie repose en partie sur la mise en évidence de sites de liaison pour les facteurs intracrines sur plusieurs organites cellulaires tels que la mitochondrie, le RE et le noyau (incluant le nucléole et le nucléoplasme) (Re et Cook 2011; Jong *et al.* 2014). Dans les prochaines sections, nous nous attarderons principalement sur le concept de compartimentation et signalisation nucléaire des RCPGs.

## 2. RCPGs nucléaires

Les RCPGs ont longtemps été considérés comme des entités de surface convertissant des signaux extracellulaires en événements biochimiques intracellulaires. Or, depuis quelques années, plusieurs équipes de recherche, incluant la nôtre, ont démontré la présence nucléaire de RCPGs venant supporter le concept des actions intracrines de différents types de ligands. Le récepteur AT1 de l'angiotensine fut l'un des premiers RCPGs dont la présence dans la région périnucléaire/nucléaire et la fonctionnalité ont été démontrées chez des cellules endothéliales, des neurones et des hépatocytes (Booz *et al.* 1992; Eggena *et al.* 1993; Lu *et al.* 1998). La présence de composantes de transduction du signal à la membrane nucléaire, dont les protéines G ( $G_s$ ,  $G_i/G_o$ ),

les enzymes effectrices (PLA<sub>2</sub>, C et D, PKC, PKA, l'adénylate cyclase et la eNOS), les canaux ioniques (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>), les pompes et échangeurs ioniques, et autres éléments impliqués dans la signalisation (MAPK p42/p44, p38, Akt) et la régulation de la signalisation des RCPGs (GRK2 et 5, β-arrestin-1), ou encore dans le métabolisme de ligands (ECA), supporte fortement l'existence de RCPGs fonctionnels au noyau (Gobeil *et al.* 2006a; Boivin *et al.* 2008; Vaniotis *et al.* 2011; Tadevosyan *et al.* 2012; Bkaily *et al.* 2014).

Notre laboratoire ainsi que ceux de nos collaborateurs ont démontré l'existence et la fonctionnalité de différents RCPGs (PGE<sub>2</sub>/EP<sub>3</sub>; PAFR, LPA1R, rAT1, rB2, ApelinR, GnRHR, et trypsine/PAR2) et éléments de signalisation associés au niveau nucléaire (Akt, MAPK p42/p44, eNOS, et COX-2) et ce dans plusieurs types cellulaires incluant l'endothélium vasculaire (Gobeil *et al.* 2002; Marrache *et al.* 2002; Bkaily *et al.* 2003; Gobeil *et al.* 2003a; Lee *et al.* 2004; Vazquez-Tello *et al.* 2004; Gobeil *et al.* 2006b; Savard *et al.* 2008; Re *et al.* 2010; Joyal *et al.* 2014). A cet égard nos récents travaux ont révélé un nouveau rôle de certains de ces RCPGs dans la régulation de calcium nucléoplasmique inductrice de l'expression de gènes cibles (ex. iNOS) (Marrache *et al.* 2002; Gobeil *et al.* 2003a; Savard *et al.* 2008). Le concept selon lequel les RCPGs peuvent se retrouver au noyau cellulaire et stimuler plusieurs réponses biologiques, s'appuie sur de nombreuses preuves expérimentales, *in vitro et in vivo*, obtenues au moyen de différentes techniques telles que la microscopie électronique ou à fluorescence de cellules et tissus normaux et pathologiques, l'autoradiographie des récepteurs avec des radioligands spécifiques injectés par voie systémique chez l'animal ainsi que par des tests fonctionnels (e.g., mobilisation de calcium nucléoplasmique, expression génique, production de seconds messagers) pour la plupart réalisés sur des noyaux intacts isolés de cellules et tissus (voir revue par Gobeil *et al.*, 2006a).

De nombreux autres exemples de RCPGs nucléaires provenant de toutes les familles ont été rapportés dans la littérature. Pour de plus amples renseignements sur l'émergence de ce nouveau paradigme en matière de compartimentation nucléaire des RCPGs et son impact sur les fonctions de ces derniers, le lecteur peut se référer à plusieurs revues de littérature pertinente (Gobeil *et al.* 2006a; Boivin *et al.* 2008; Re et Cook 2011; Vaniotis *et al.* 2011; Tadevosyan *et al.* 2012; Joyal *et al.* 2015).

La stimulation des récepteurs nucléaires entraîne une grande variété de réponses telles que des changements dans le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  nucléoplasmique, l'activité des protéines kinases (Akt, MAPK p42/p44 et MAPK p38) ainsi que la régulation de la transcription subséquente de gènes comme *cfos*, *eNOS*, *COX-2* et *iNOS* (Gobeil *et al.* 2006a).

Les RCPGs nucléaires peuvent avoir des fonctions distinctes de leurs homologues localisés à la membrane cellulaire (Re 2002). Pour le récepteur EP3 de la  $\text{PGE}_2$  et le récepteur du PAF, nous avons déterminé que les récepteurs nucléaires et membranaires ont une pharmacologie semblable mais que leur couplage aux protéines G diffère (Gobeil *et al.* 2002; Marrache *et al.* 2002). À cet égard, nous avons montré que la stimulation des récepteurs EP3 par un agoniste sélectif qui traverse la membrane plasmique via un transporteur spécifique, conduit à une augmentation de l'expression du gène *eNOS* dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, augmentant ainsi la réponse vasodilatatrice NO-dépendante de la substance P *in situ* au niveau des microvaisseaux cérébraux de porcelet (évaluée par la technique de vidéo-imagerie) alors que la stimulation des récepteurs EP3 de surface est liée à des réponses contractiles aiguës (Gobeil *et al.* 2002; Gobeil *et al.* 2003b). Ceci constitue une première démonstration de la pertinence physiologique de RCPGs nucléaires, au-delà des modèles *in cellulo*, dans le contrôle de l'expression génique pouvant moduler un processus physiologique, soit la régulation du débit sanguin cérébral dans ce cas-ci. Les groupes de Robben et Joyal ont également démontré des fonctions distinctes pour d'autres RCPGs nucléaires *in vivo* dans des modèles murins. En effet, le groupe de Robben a montré qu'il était possible d'activer des formes mutantes du récepteur de type 2 de la vasopressine (V2R) retenues dans la zone périnucléaire avec des agonistes perméants et que l'activation de ces récepteurs intracellulaires n'entraînait pas la dégradation de ces derniers contrairement aux récepteurs membranaires. Ils ont également démontré que l'activation des V2R intracellulaires ne changeait pas leur localisation subcellulaire (Robben *et al.* 2009). Le groupe de Joyal pour sa part, a démontré que l'activation du récepteur de type 1 du facteur II de coagulation (F2RL1, aussi connu sous le nom de Par2), un récepteur retrouvé dans les cellules rétinales de ganglions et jouant un rôle important dans l'angiogenèse durant le développement rétinien, entraîne l'expression de différents gènes selon sa localisation subcellulaire. L'activation de F2RL1 à la membrane mène à l'expression d'Angiopoïétine-1 (Ang1) impliqué dans la maturation des

vaisseaux alors que l'activation de F2RL1 nucléaire mène plutôt à l'expression de Vegfa impliqué dans la néovascularisation (Joyal *et al.* 2014).

Les récepteurs mGluR5 membranaires et nucléaires activent tous deux la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire mais selon une cinétique différente. En effet, l'activation des récepteurs de surface amène une réponse calcique rapide et de courte durée se traduisant par l'activation de JNK, CaMK et CREB, alors que l'activation des récepteurs nucléaires produit une réponse calcique de plus longue durée amenant l'activation de la voie de ERK1/2 ainsi que la phosphorylation de Elk-1 (Jong *et al.* 2009).

Par ailleurs, on a noté que la distribution subcellulaire de certains RCPGs peut varier en contexte pathologique. En effet, plusieurs groupes de recherche indépendants ont démontré une surexpression et localisation nucléaire de RCPGs dans de nombreux cancers dont, entre autres, les cancers de l'utérus, de la prostate et du sein (Spano *et al.* 2004; Lo *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005; Gobeil *et al.* 2006a; Lee *et al.* 2007; Speetjens *et al.* 2009; Davies *et al.* 2010; Davies *et al.* 2011; Valdehita *et al.* 2010). Dans certains cas, la présence nucléaire des RCPGs corrèle de manière significative avec un mauvais pronostic pour les patients (ex. CXCR4 et CysLT1) (Shibuta *et al.* 2002; Nielsen *et al.* 2005; Valdehita *et al.* 2010; Don-Salu-Hewage *et al.* 2013).

En ce qui concerne le SKK, plusieurs groupes ont démontré la présence de composantes de ce système au niveau intracellulaire chez divers types de cellules de mammifères en plus de ceux retrouvés dans les systèmes d'expression hétérologues (ex. HEK-293) (Lee *et al.* 2004; Takano *et al.* 2014). Il existerait donc une expression constitutive des rB2 dans les noyaux de neurones de cerveau (Chen *et al.* 2000) et des hépatocytes de rats (Savard *et al.* 2008). Fait intéressant, on a noté une augmentation de l'expression nucléaire des rB1 et rB2 dans les neurones chez un modèle expérimental d'épilepsie (Chen *et al.* 2000). Les causes et les conséquences physiopathologiques de ce phénomène demeurent obscures. On a observé la présence de Kt ainsi que des rB1 et rB2 dans la région périnucléaire de cellules endothéliales microvasculaires humaines (Wright *et al.* 2008). Une autre étude a révélé la présence nucléaire de la Kt et de la Kp ainsi que des rB1 et rB2 chez les cellules de cancer du poumon et de mésothéliome pleural (Chee *et al.* 2007; Chee *et al.*

2008). Notre groupe a aussi démontré la présence de rB1 nucléaires chez les gliomes de rat F98 et dans des spécimens de gliomes humains malins (Fortier 2007; Côté *et al.* 2012).

Enfin, en lien avec cette thèse, dont l'objectif est d'approfondir le lien entre les récepteurs des kinines et les TNBCs, les résultats de nos travaux préliminaires, réalisés essentiellement avec la lignée TNBC MDA-MB-231, nous portent à croire que les récepteurs nucléaires des kinines jouent un rôle potentiellement important dans la régulation de la prolifération et de la survie de ce type de cancer (Fortier 2007). En effet, les travaux antérieurs du laboratoire ont permis de démontrer l'expression et la localisation nucléaire des rB2 dans les cellules MDA-MB-231. De plus, certains antagonistes rB2 ont montré de puissants effets antiprolifératifs possiblement attribuables à leur capacité de pénétrer les cellules et d'interagir avec les rB2 nucléaires (Fortier 2007).

### *2.1 Origines des RCPGs nucléaires*

La façon dont les RCPGs se retrouvent au noyau n'est toujours pas complètement élucidée. Une explication plausible implique une translocation des RCPGs au noyau suite à leur activation par liaison de ligands tel que rapporté pour les AT1-R, VPAC1 et S1P1 (Lu *et al.* 1998; Chen *et al.* 2004; Thomas *et al.* 2006; Estrada *et al.* 2009; Valdehita *et al.* 2010). Toutefois, plusieurs RCPGs ont montré une localisation nucléaire constitutive pouvant survenir apparemment sans liaison au préalable de ligands (ex. récepteurs de LPA, de l'apeline, de l'angiotensine, de l'ocytocine, de la BK et de la S1P) (Gobeil *et al.* 2003a; Lee *et al.* 2004; Kinsey *et al.* 2007; Savard *et al.* 2008; Padmanabhan *et al.* 2009).

La présence d'un segment SLN monopartite classique (motif K-K/R-X-K/R) dans la portion C-terminale de certains RCPGs (AT1, apeline, rB2, PTH1R), laquelle médierait leur transfert au noyau via des importines, a été proposée pour expliquer leur présence dans cet organite (Lee *et al.* 2004; Pickard *et al.* 2006; Morinelli *et al.* 2007). Toutefois, plusieurs RCPGs retrouvés au noyau n'ont pas de SLN typique. Les modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation pourraient également entraîner une localisation nucléaire des RCPGs. En effet, certaines glycoprotéines peuvent être importées du cytosol au noyau par un mécanisme requérant la N-

glycosylation (Gobeil *et al.* 2006a). Le processus de N-glycosylation débute dans le RE pour s'achever dans l'appareil de Golgi. Outre la glycosylation, la voie des cavéoles pourrait également participer à la localisation nucléaire de certains RCPGs situés à la membrane plasmique puisque, par exemple, LPA1-R colocalise avec la cavéole dans des extraits nucléaires (Gobeil *et al.* 2003a; Zhu *et al.* 2006). Dans le cas des récepteurs CCR2 de la chimiokine CCL2, l'internalisation du complexe ligand-récepteur est suivie par une interaction avec Trn1 qui entraîne une localisation du récepteur à la périphérie de l'enveloppe nucléaire (Favre *et al.* 2008). La Figure 7 résume les voies possibles pouvant expliquer la présence de RCPGs au noyau.

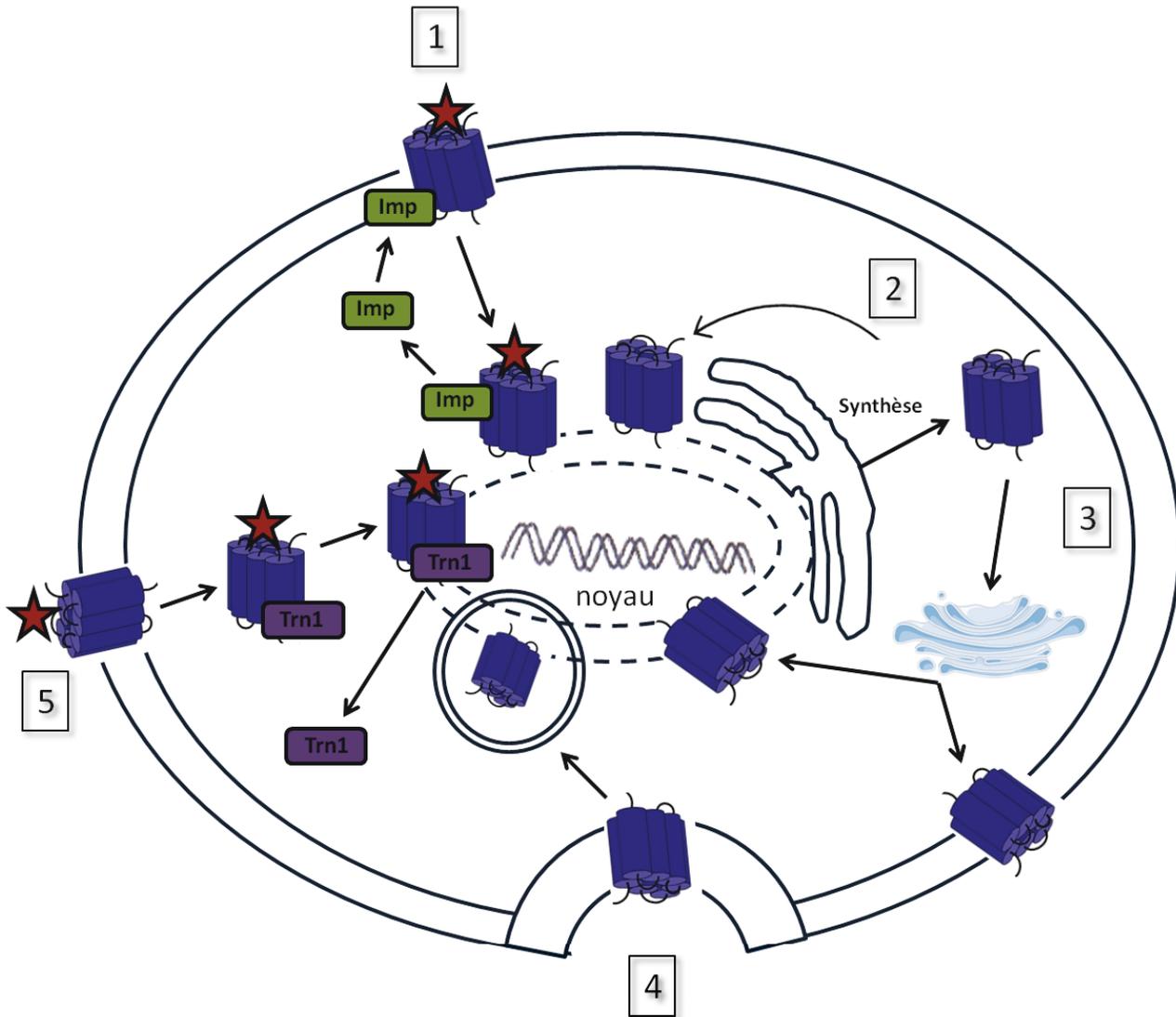


Figure 7: Origines potentielles des RCPGs nucléaires.

(1) Translocation ligand-dépendante du récepteur de la membrane plasmique au noyau via la reconnaissance d'un SLN par les importines (imp), (2) synthèse *de novo* du récepteur dans le RE (sans maturation) puis diffusion latérale dans la membrane externe du noyau (3) transport vésiculaire du récepteur mature en partance de l'appareil de Golgi et fusion au contact de la membrane nucléaire ou plasmique, (4) translocation ligand-indépendante et insertion dans l'enveloppe nucléaire via les cavéoles et (5) translocation ligand-dépendante de la membrane plasmique vers le noyau via Trn1 (5) (Tirée et adaptée de la thèse de Nguyen (2013).

### 3. Stratégies de couplage des ligands peptidiques pour traverser les membranes cellulaires

Mise à part quelques exceptions (p. ex. dynorphine, substance P, urotensine), la plupart des ligands peptidiques pour les RCPGs, incluant les kinines et leurs dérivés, ne peuvent traverser complètement la membrane plasmique par diffusion passive due à leur nature hydrophilique (Savard *et al.* 2008; Doan *et al.* 2012).

Il existe plusieurs stratégies pour permettre à des peptides et autres agents hydrophiles de pénétrer à l'intérieur de cellules. En effet, la conjugaison d'un peptide à un vecteur peptidique, lipidique, glycosidique ou encore à une séquence riche en acides aminés hydrophobiques sont des méthodes efficaces pour permettre à des peptides de traverser la membrane cellulaire (Stephens et Pepperkok 2001; Gras-Masse 2003; Bolhassani 2011; Cascales *et al.* 2011; Madani *et al.* 2011; Bechara et Sagan 2013).

#### 3.1 Vecteurs peptidiques (ou peptides pénétrants (PP) les cellules)

La membrane cellulaire constitue une barrière efficace pour les molécules hydrophiles. En 1988 il fut découvert qu'une protéine polycationique naturelle nommée *trans-acting activator of transcription* (Tat) du virus d'immunodéficience humaine (VIH) pouvait passer efficacement la membrane de cellules de mammifères. Suivant cette découverte, d'autres peptides polycationiques d'origine naturelle (VP22, penetratine (AntP)) ou synthétique (ex. transportan) ont également été identifiés comme vecteurs de transfert, pour différentes classes de molécules biologiquement actives (p. ex., autres peptides, protéines, médicaments, nanoparticules, oligonucléotide antisens, etc.), à travers la membrane cellulaire (Ziegler *et al.* 2005; Mae 2009). Les molécules cargos peuvent être liées de manière covalente ou non aux PPs (Bechara et Sagan 2013).

Il existe plus d'une centaine de PPs. Ces derniers sont principalement regroupés en trois catégories: les PP cationiques, les PP amphipatiques et les PP hydrophobiques (Milletti 2011). Les peptides cationiques (ex. VIH-Tat(47-57) et penetratine) sont constitués d'une courte séquence d'acides aminés principalement composée d'arginines, de lysines et d'histidines. Ce sont ces trois

acides aminés qui sont majoritairement responsables de l'interaction du peptide avec le motif anionique de la membrane plasmique. Les peptides amphiphatiques (ex. Pep-1, pVEC et ARF) pour leur part possèdent une partie lipophile et une autre hydrophile qui sont responsables de la translocation à travers la membrane plasmique. Enfin, les PP hydrophobiques (ex. Pepducins) contiennent des résidus apolaires avec une faible charge nette totale ou encore un motif hydrophobe essentiel (Schroeder 2010; Milletti 2011; Bechara et Sagan 2013).

La façon dont les PP traversent la membrane n'est pas encore entièrement connue mais on sait toutefois que vu leur charge élevée à pH physiologique, la diffusion passive est exclue. Les mécanismes classiques d'internalisation utilisant les récepteurs ou les transporteurs ne semblent pas non plus impliqués. L'endocytose via la macropinocytose, les cavéoles, les puits de clathrines ou les radeaux lipidiques, demeure une possibilité (Thoren *et al.* 2003; Deshayes *et al.* 2005; Jones *et al.* 2005). Certains PP cationiques sont capables d'atteindre le cytoplasme de plusieurs façons incluant des pores, des micelles inversées, la diffusion passive à travers la bicouche lipidique et l'endocytose (Drin *et al.* 2003; Alves *et al.* 2009; Madani *et al.* 2011).

L'avantage des PP comparativement aux liposomes ou encore aux polymères est l'absence de toxicité (Gupta *et al.* 2005). De plus, certains PPs tels que le Tat ne provoquent pas de réaction immunitaire (Schroeder 2010). Plusieurs études ont démontré l'efficacité de Tat à faire pénétrer dans les cellules des molécules cargo de petites et grandes tailles moléculaires, et ce, autant *in vitro* qu'*in vivo*. De plus, Tat est très peu toxique et cause peu de perturbation à la membrane plasmique, et ce même à des concentrations élevées (jusqu'à 100  $\mu$ M). Tat n'affecte pas non plus la prolifération ou la différenciation cellulaire et n'interfère pas avec l'activité biologique des molécules auxquelles il est lié, ce qui en fait un vecteur de choix pour livrer des molécules notamment vers le noyau (Brooks *et al.* 2005; Gupta *et al.* 2005). Cependant, son manque de spécificité vis-à-vis d'un tissu ou d'un type cellulaire doit être pris en compte lors de son exploitation en tant que vecteur pour le transport intracellulaire de diverses molécules.

### 3.2 Vecteurs lipidiques

Quoique les vecteurs peptidiques tels que Tat soient les plus populaires, les vecteurs lipidiques représentent aussi une avenue intéressante pour faciliter l'incorporation intracellulaire de divers agents incluant des peptides (Gras-Masse 2003; Neugebauer *et al.* 2005). En effet, plusieurs études ont démontré la capacité des lipopeptides à échapper aux endosomes et à la dégradation lysosomale et ainsi produire divers effets intracellulaires, dont l'inhibition de kinases/protéases et de différentes voies de signalisation activées par des cytokines (Gras-Masse 2003). Nos travaux antérieurs ont démontré que la liaison covalente de peptides dérivés des kinines à une chaîne carbonée aliphatique de longueur variable ou à un stéroïde (p. ex., cholestérol, acide cholique) pour ainsi former un lipopeptide permet une incorporation intracellulaire dudit peptide, possiblement par un mécanisme de diffusion passive (Neugebauer *et al.* 2005; Neugebauer *et al.* 2008). Les principaux avantages des lipopeptides sont une grande efficacité, peu de restrictions au niveau de la grosseur et du type de molécules cargos et plusieurs applications *in vivo* sont possibles. Par contre, au niveau des désavantages, le plus important est qu'ils peuvent interférer avec le métabolisme des lipides d'où une toxicité potentielle et la non-spécificité du système pour un ciblage cellulaire (Stephens et Pepperkok 2001).

## CHAPITRE 3

### *Hypothèse et objectifs*

Tel que décrit précédemment, la notion des fonctions intracrines des RCPGs intracellulaires (essentiellement nucléaires) émerge progressivement. À cet effet, plusieurs groupes de recherche, incluant le nôtre, ont mis en évidence un nouveau rôle des RCPGs nucléaires dans la régulation de la transcription de gènes au niveau de plusieurs types cellulaires (voir revues par Gobeil *et al.* 2003a; Gobeil *et al.* 2006a; Boivin *et al.* 2008; Vaniotis *et al.* 2011). Cette perspective ouvre la voie au développement de médicaments présentant une meilleure spécificité dans leur action. Par ailleurs, les kinines peuvent jouer un rôle important dans la croissance, la survie, l'invasion et l'angiogenèse tumorale de plusieurs types de cancers. Plusieurs composantes du SKK (KHPM, KFPM, Kt, Kp, rB1 et rB2) sont surexprimées dans les cancers (voir revues par Figueroa *et al.* 2012; Whalley *et al.* 2012; da Costa *et al.* 2014). Les études immunohistochimiques ont révélé une localisation intracellulaire/nucléaire prédominante des rB1 et rB2 dans plusieurs types de cancers (Côté *et al.* 2012). L'ensemble de ces données concorde avec la notion que les kinines puissent agir de manière intracrine pour réguler l'expression de gènes associés à la tumorigenèse et la progression tumorale et que le blocage de leurs récepteurs intracellulaires/nucléaires, par le développement d'antagonistes perméants, pourrait donc constituer une stratégie anticancéreuse potentiellement efficace. Ceci constitue le point central de notre hypothèse. Il est à noter que cette thèse s'inscrit dans la continuité de nos travaux antérieurs préliminaires sur le sujet (Fortier 2007).

À partir de cette hypothèse, nous nous sommes donné les 4 objectifs spécifiques suivants:

**OBJECTIF 1** : Déterminer l'expression et la distribution subcellulaire des récepteurs des kinines chez des lignées tumorales de cancer du sein (dont une lignée de cancer du sein triple-négative) ainsi que dans des biopsies mammaires malignes humaines;

**OBJECTIF 2** : Développer et caractériser de nouveaux antagonistes perméants pour l'étude des fonctions des récepteurs des kinines intracellulaires/nucléaires;

**OBJECTIF 3** : Déterminer *in vitro* les effets des antagonistes perméants et non perméants sur la prolifération et l'induction de l'apoptose des cellules MDA-MB-231;

**OBJECTIF 4** : Déterminer *in vitro* l'impact de l'inactivation du gène du rB2 des kinines (knockdown) sur la prolifération et la viabilité des cellules MDA-MB-231.

# CHAPITRE 4

## *Matériel et méthodes*

### *Culture cellulaire*

Les lignées cellulaires mammaires humaines MCF-10A, MCF-7, ZR-75-1, T47D et MDA-MB-231 ainsi que la lignée épithéliale de singe COS-1 ont été achetées de l'American Type Culture Collection et maintenues dans le DMEM (MCF-7, MDA-MB-231 et COS-1), le RPMI (T47D), ou le DMEM F12 (ZR-75-1) comprenant 10 % de sérum fœtal bovin inactivé, 2mM de L-glutamine, 100U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les MCF-10A (gracieuseté du Dr. A. Giordano, États-Unis) ont été maintenues dans le MEMB supplémenté de 5 % de sérum de cheval, 0,5 µg/ml d'hydrocortisone, 10 µg/ml d'insuline, 2ng/ml de EGF ainsi que 0,1 µg/ml d'enterotoxines de choléra. La culture primaire de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de porcelet (gracieuseté du Dr. S. Chemtob, Canada) a été cultivée dans le milieu DMEM tel que décrit (Gobeil *et al.* 2002; Gobeil *et al.* 2003a; Gobeil *et al.* 2003b). Les cellules ont été récoltées avec de la trypsine/EDTA 0,05 % pour permettre les passages ou les récoltes cellulaires.

### *Réactifs et anticorps*

Les anticorps, contre la caspase-3 clivée et Akt ont été achetés de Cell Signaling Technology (Danvers, États-Unis). Les anticorps, pour la clathrine, la lamine A/C, la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, Bcl-2, p27 et la cycline A ont tous été achetés chez Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, États-Unis). Les anticorps, contre Bad ont été obtenus de BD Bioscience (Mississauga, Canada), alors que celui contre XIAP provenait de Stressgen (Victoria, Canada). L'anti-calnexine a été achetée chez Abcam (Toronto, Canada) et l'anti β-actine chez Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Les anticorps contre ERK1/2 ont été obtenus de Promega (Madison, États-Unis), alors que ceux contre p38 et phospho-p38 (Thr180/Tyr182) ont été achetés chez EMD Millipore (Etobicoke, Canada). Les isotypes contrôles de lapin et de souris ont été obtenus de Dako (Burlington, Canada) et Biolegend (San Diego, États-Unis) respectivement. Les anticorps primaires utilisés au cours de ce projet sont :

l'anticorps polyclonal de lapin anti-rB1 humain LS-A799 (épitope contre la partie C-terminale), rB2 LS-A797 (épitope contre la partie C-terminale) (LifeSpan Biosciences Inc, Seattle, États-Unis) et RC72 (épitope contre la partie C-terminale) (gracieuseté du Dr. R. Couture, Canada). L'antisérum de lapin anti-rB1 (AS434; épitopes contre des domaines extracellulaires et intracellulaires) (Blaukat *et al.* 1999; Bélanger *et al.* 2009; Côté *et al.* 2012) ainsi que celui du KHPM (HKH4, sous-type IgG<sub>2aκ</sub> dirigé contre le domaine D1 de la chaîne lourde humaine) ont gracieusement été fournis par le Dr. W. Muller-Esterl (Allemagne) (Hock *et al.* 1990). Les antisérums, contre la Kt et BK, ont gracieusement été fournis par les Drs. F. Alhenc-Gelas et N. Bouby (France) (Reis *et al.* 1985). Les anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin conjugués à la HRP ont été achetés chez Sigma-Aldrich et AbD-Serotec (Raleigh, États-Unis) respectivement. L'anticorps anti-souris conjugué à l'Alexa-488 ainsi que le Hoechst 33342 ont été obtenus de Molecular Probe (Life Technology, Canada) alors que l'ALEXA-568 anti-chèvre provient de Santa Cruz. Finalement, les agents de chimiothérapie utilisés, lors de ce projet, ont été obtenus de la pharmacie du CHUS en ce qui concerne la doxorubicine, la carboplatine ainsi que le témozolomide et de Sigma-Aldrich, pour le paclitaxel et la carmustine.

### *Synthèse peptidique en phase solide*

Tous les peptides ont été assemblés sur support solide à l'aide d'un synthétiseur de peptides Pioneer utilisant la stratégie Fmoc (9-fluorenylmethoxy-carbonyl) (Côté *et al.* 2009). Les peptides ont ensuite été purifiés par RH-HPLC analytique et avaient une pureté >95 % avec le spectre de masse attendu. Dans le cadre d'un projet visant à développer de nouveaux peptides pénétrants, plusieurs peptides perméants basés sur les kinines ont été synthétisés par la liaison de la séquence de Tat (NH<sub>2</sub>-<sup>48</sup>GRKKRRQRRR<sup>58</sup>-COOH) en configuration D pour conférer une stabilité protéolytique) soit à la partie N-terminale de la séquence déacétylée de l'antagoniste R954 (rB1), Hoe 140 (rB2) ou encore de l'agoniste BK et comprenant trois résidus glycyll comme espaceur (pour éviter l'encombrement stérique) (Neugebauer *et al.* 2002; Gobeil *et al.* 2014). Une autre approche également adoptée dans la synthèse des antagonistes fut la conjugaison d'une partie lipidique lauryl acyl et d'acide cholique à la partie N-terminale de la forme déacétylée de l'antagoniste R715 (rB1) (Gobeil *et al.* 1996a) et du Hoe 140 (rB2), respectivement, tous deux liés à la résine (Neugebauer *et al.* 2005; Neugebauer *et al.* 2008). Ces peptides ont été conservés à

-20°C sous forme de poudre et une solution mère de 10mM a également été préparée avec de l'eau Nanopure et conservée à -20°C, pour chacun des composés. Finalement, l'antagoniste rB1 non peptidique SSR240612 provient de Sanofi-Aventis R&D (France) et a été lui aussi préparé avec de l'eau Nanopure.

#### *Essais de liaison de compétition*

Les essais de compétition avec radioligands ont été réalisés avec des cellules HEK 293T (ATCC) transfectées transitoirement avec le rB1 ou rB2 humain selon le protocole décrit dans (Côté *et al.* 2009). L'affinité de liaison des composés est exprimée en valeur  $IC_{50}$  soit la valeur en concentration molaire d'agoniste non marqué nécessaire pour déplacer 50 % de la liaison spécifique.

#### *Essais fonctionnels avec vaisseaux sanguins humains isolés*

L'activité des antagonistes peptidiques et autres composés sur les rB1 et rB2 exprimés de façon endogène dans des veines de cordon ombilical dénudées d'endothélium (VOH) a été déterminée tel que décrit par (Gobeil *et al.* 1996b; Bélanger *et al.* 2009). Notre groupe a en effet démontré par le passé que la VOH exprime les deux types des récepteurs des kinines (rB1 et rB2) et représente donc un bon modèle *ex vivo* pour déterminer l'activité des antagonistes des kinines (Gobeil *et al.* 1996b). L'affinité apparente des antagonistes est exprimée en termes de valeur  $IC_{50}$ , c'est-à-dire la concentration molaire d'un antagoniste qui réduit une réponse spécifique sous-maximale de DBK de 50 % de sa valeur originale, la réponse mesurée étant la contraction des vaisseaux. L'utilisation de veines de cordon ombilical a été approuvée par le comité d'éthique local et le consentement maternel a été obtenu à chaque fois.

#### *Détermination du $\log D_{7,4}$*

La détermination du coefficient de distribution ( $\log D$ ) des composés entre l'octanol et 0,1 M de tampon de sodium de phosphate, pH 7,4 (PBS), a été réalisée par la méthode classique de mélange en ballon. Ce paramètre a été déterminé comme approprié pour prédire la perméabilité

membranaire passive à des composés spécifiques. Les composés ayant un log D entre 0 et 3 sont considérés comme étant hautement perméables. En résumé, des volumes égaux d'octanol et de PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7, 4) ont été mélangés puis laissés reposer jusqu'à équilibration pendant 24 h. Les phases ont ensuite été séparées et entreposées à 4°C. Pour les tests, une solution de 200 µM du composé à tester a été mélangée au système biphasique, vortexée puis agitée pendant 2 h à température pièce. Le mélange a ensuite été centrifugé pendant 5-10min à 1000Xg, puis des aliquots de chaque phase ont été récoltés et analysés par RP-HPLC (système HPLC Agilent 1100). L'aire sous la courbe du pic correspondant au composé a été intégrée pour chaque phase et le Log D calculé de la façon suivante:  $\text{Log } D_{7,4} = \log_{10} (\text{aire sous la courbe de la phase de l'octanol} / \text{aire sous la courbe de la phase du PBS})$ .

### *Essais de perméabilité cellulaire*

La perméabilité des cellules MDA-MB-231 aux antagonistes rB1 et rB2 a été évaluée par LC-MS/MS. Les cellules à 80 % de confluence dans du DMEM sans sérum ont été traitées avec une concentration non toxique (2,5µM) d'antagoniste à 37°C, selon les temps indiqués et variant de 24 à 72 h. À la fin du traitement avec l'antagoniste, un lavage acide a été fait sur les cellules pour faciliter la relâche de ligand lié à la surface de la membrane. Le contenu cellulaire a été récolté par lyse hypotonique à l'aide d'un mélange 40:60 de Tris-HCl 15mM, pH 7,4 : Méthanol. Les lysats cellulaires ont ensuite été soniqués et une précipitation de protéine faite suivant une addition d'acide formique de 0,1 % v/v. Les protéines précipitées ont été retirées par centrifugation et les surnageants concentrés par évaporateur SpeedVac. Les échantillons ont par la suite été quantifiés par LC-MS/MS sur un spectromètre de masse quadrupole triple (Agilent G6410B). Une courbe de calibration faite de neuf concentrations des composés de référence dissous dans des solvants de phase mobile de HPLC appropriés a été utilisée pour estimer la concentration intracellulaire de chaque échantillon, la limite de quantification étant de 75 fmol.

### *Microscopie confocale*

Les MDA-MB-231 ont étéensemencées sur des coverslips ronds à une densité de 70 % puis fixées à la paraformaldéhyde (2 %) et traitées à la saponine (0,1 %) dans du PBS (pH 7,4) pour être

perméabilisées. Avant d'être exposés aux anticorps primaires (anti-BK, anti-Kt et anti-KHPM) dans le PBS à 4°C pendant la nuit ou 1-2 h à température pièce, les sites non spécifiques ont été bloqués (BSA 5 %). Après les traitements, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS et exposées aux anticorps secondaires (ALEXA-568 anti-chèvre ou ALEXA-488 anti-lapin pendant 1 h). Après un lavage final, les noyaux ont été marqués avec la sonde fluorescente DAPI (100nM) lorsqu'indiqué puis mise dans du milieu Vectashield et la présence ainsi que la localisation du marqueur fluorescent ont été analysées avec un microscope confocal (FV1000, Olympus, Japon) couplé à un microscope inversé avec un objectif de 63X avec huile à immersion (Olympus). Les expériences ont été réalisées avec des anticorps anti-kallicréine (gracieusement fournis par les Drs. Alhenc-Gelas et Bouby, France) et anti-kininogène (gracieusement fourni par le Dr. Müller-Esterl, Allemagne).

#### *RT-PCR quantitatif en temps réel*

L'ARN total des lignées cellulaires de sein a été isolé à l'aide du kit d'isolation d'ARN Qiagen RNeasy mini, selon les instructions du fabricant. La transcription inverse a ensuite été réalisée à 42°C, pendant 50 min, en utilisant la transcriptase inverse SuperScriptII et les amorces aléatoires d'Invitrogen, puis le PCR quantitatif a été fait sur un M3000p de Stratagene (Agilent technologies, Canada) avec le SYBR Green (Quanta Biosciences, États-Unis), pour 40 cycles à 95°C pendant 15sec suivi de 60°C, pendant 30sec. Les amorces utilisées, pour cette technique sont: pour rB1 (NM\_000710.3) 5'-TAAACGATTCTCCCACCTCAGCCT-3' (sens) et 5'-GCATTGTCACAGGCCGTAGCATTT-3' (anti-sens) qui donnent un amplicon de 141pb, pour rB2 (NM\_000623.3) 5'-AGTACCAGGGAGCGACTGAA-3' (sens) et 5'-GTGACATTGAGCATGTCGGC-3' (anti-sens) qui donnent un amplicon de 176pb, alors que pour  $\beta$ -actine (NM\_001101.3) les amorces étaient 5'-GTTGCTATCCAGGCTGTGCTA-3' (sens) et 5'-GCGGATGTCCACGTCACACTT-3' (anti-sens) qui donnent un amplicon de 471 pb. La méthode de comparaison des Ct a été utilisée pour quantifier les transcrits qui étaient normalisés selon l'expression de la  $\beta$ -actine. Des réactions contrôles en absence de transcriptase inverse ont également été faites pour démontrer l'absence de contamination par ADN génomique de nos échantillons d'ARN.

### *Immunobuvardage*

L'extraction de protéines totales et la détermination de la concentration ont été faites tel que décrit par (Gobeil *et al.* 2006b; Savard *et al.* 2008). La préparation d'extraits de membranes et de noyaux a aussi été réalisée, selon un protocole décrit précédemment par ces mêmes groupes. En résumé, les quantités appropriées de lysat cellulaire, fraction membranaire ou nucléaire ont été dénaturées, migrées sur gel SDS-PAGE puis transférées sur membrane de PVDF. Les membranes ont ensuite été bloquées avec une solution de lait 5 % et marquées, dans un premier temps, avec un anticorps primaire pendant 18 h à 4°C, puis avec un anticorps secondaire chèvre anti-lapin (1:10000) ou anti-souris (1:20000) couplé à HRP pendant 60 min à température pièce. Finalement, un kit de détection, par chemiluminescence, a été utilisé (selon les instructions du manufacturier (Perkin-Elmer, États-Unis), pour révéler les protéines à l'aide de films Kodak X-Omat. L'expression cellulaire et le taux de phosphorylation des protéines ont été déterminés selon un protocole décrit par (Gobeil *et al.* 2002; Gobeil *et al.* 2006b; Savard *et al.* 2008). Les extraits protéiques HMEC utilisés comme contrôle ont été achetés de ScienCell (Carlsbad, CA, É.-U.).

### *Microscopie électronique et immunohistochimie d'échantillons de tissus humains*

Des spécimens de tissus humains de cancer du sein triple-négatif et de tissus normaux adjacents ont été obtenus de deux patientes lors de la résection de leur tumeur primaire à l'hôpital Hôtel-Dieu de Sherbrooke (Canada). L'utilisation de ces échantillons a été approuvée par le comité institutionnel. L'immunomarquage avec nanoparticules d'or a été réalisé sur des sections Epon ultra minces (50 nm) montées sur des grilles de nickel tel que décrit précédemment par (Savard *et al.* 2008). Les sections ont ensuite été incubées avec l'antisérum rB1 AS-434 (1 h 25) lapin anti-rat (réaction croisée avec l'humain) suivi d'une incubation avec un IgG (1 h 20) conjugué à un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à des nanoparticules d'or (10 nm) (Sigma-chemical Co.). Les sections ont été contrastées et visualisées tel que décrit précédemment par (Savard *et al.* 2008). Des contrôles négatifs ont également été faits en omettant les anticorps primaires et en les remplaçant par du sérum préimmun ou un isotype contrôle IgG. L'aire nucléaire et cytoplasmique a par la suite été analysée avec le programme Image J (National Institute of Health, JAVA 1.60\_02) (Lessard *et al.* 2009). Une moyenne de 10 à 15 cellules couvrant une surface d'un

minimum de  $200\mu\text{m}^2$  par échantillon a été analysée générant environ 50 images d'une magnification allant de 40 000 x à 60 000 x. Les paramètres utilisés pour les comparaisons statistiques étaient: 1) le nombre de particules d'or dans le noyau/l'aire totale du noyau et 2) le nombre de particules d'or dans le cytoplasme/aire total du cytoplasme.

### *Essai de clonogénicité*

Les cellules (400/puits) ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits avec 2 ml de milieu et incubées pendant deux semaines à 37°C avec soit un antagoniste rB1, rB2 ou un agoniste rB1 ou rB2 à des concentrations variant de 1 à 100  $\mu\text{M}$ . Après traitement, le milieu a été retiré et les colonies colorées et fixées avec 0,5 % de bleu de méthylène dans 50 % de méthanol puis rincées et séchées. Le décompte des colonies a été réalisé avec le programme Image Pro plus 5.1. Dans certaines expériences, les cellules ont été pré-traitées avec le HOE-140 ou le R-954 (10  $\mu\text{M}$ ) (pour bloquer, respectivement, les rB2 et rB1 de la membrane cellulaire) pendant 15 min, puis incubées avec les autres composés à l'étude.

### *Croissance en milieu semi-solide*

Les cellules (6000 cellules/puits) ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et incubées pendant une semaine à 37°C, en présence de l'antagoniste voulu. À la fin du traitement, environ 3 000 cellules viables (évalué par bleu de trypan) comptées avec un hémocytomètre ont été mélangées avec de l'agar mou (0,38%) (environ 42°C) contenant du milieu de croissance et versées dans une plaque à 6 puits. Finalement, les colonies ont été comptées (sans coloration au préalable) en utilisant un microscope inversé et analysées après 3 semaines d'incubation à 37°C avec du milieu RPMI (contenant la concentration voulue d'antagoniste) à la surface de l'agar et changé régulièrement (2 fois/semaine) pour empêcher l'agar de sécher. Neuf champs aléatoires ont été analysés avec un microscope optique pour la comptabilisation des colonies dans toute l'épaisseur du milieu agar. Les effets anti-prolifératifs des antagonistes sur les cellules MB-MDA-231 mises dans ces conditions expérimentales ont ensuite été quantifiés puis comparés aux cellules contrôles n'ayant subis aucun traitement.

### *Détection de l'apoptose*

L'apoptose cellulaire a été déterminée par cytométrie de flux à l'aide du kit de marquage à l'annexin V-Fluos/iodure de propidium (Roche, Canada) selon les instructions du manufacturier ainsi que décrit par (Bovenzi *et al.* 2010). Les cellules à confluence ont été traitées avec les antagonistes et incubées dans du milieu de culture sans sérum pendant 24 h à 37°C. Après le traitement avec les antagonistes, les cellules adhérentes ainsi que les cellules flottantes ont été recueillies, fixées et marquées à l'annexin-V et à l'iodure de propidium (100 µl par échantillon contenant 2 µl d'annexin-V-Fluos et 1 µl d'iodure de propidium) pendant 15 min à température pièce. Les cellules ont ensuite été analysées par FACScan (BD Biosciences, États-Unis) ainsi que le logiciel CellQuest. Brièvement, l'état des cellules est évalué selon leur positivité à l'iodure de propidium (axe de l'ordonnée) et l'annexine V (axe de l'abscisse) par une technique de cadrans ou « gates » positionnés à partir du nuage de cellules viables non traitées (cadrant inférieur gauche, négatif pour l'annexine V et l'iodure de propidium). Ainsi, les cellules se trouvant dans le quadrant inférieur droit (positif pour l'annexine V, négatif pour l'iodure de propidium) sont considérées en apoptose précoce alors que celles des cadrans supérieurs (droit et gauche) sont considérées en apoptose tardive/nécrose. Une séquence de 1000 événements (cellules) est utilisée pour déterminer le pourcentage de cellules dans chaque phase.

### *Essais de prolifération et de toxicité cellulaire par MTT*

Les essais de prolifération et de toxicité cellulaire chez les MDA-MB-231 ont été déterminés par la méthode colorimétrique MTT tel que décrit par (Bovenzi *et al.* 2010; Côté *et al.* 2012). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits (2 000 cellules/puits pour tests de prolifération), dans du milieu de culture avec sérum pendant 24 h à 37°C. Les cellules ont ensuite été incubées avec les antagonistes aux concentrations et aux temps indiqués. À la fin du traitement, une solution de 0,05 mg/ml de concentration finale de MTT a été ajoutée et incubée pendant 90 min à 37°C. La solution de MTT a ensuite été retirée des puits et les sels de formazan solubilisés avec une solution de 1:25 HCl 1N: Isopropanol. Finalement, l'absorbance a été lue par lecteur de microplaque ELISA à 570 nm (Spectra Max Plus, Molecular Devices, États-Unis). Pour les essais de cytotoxicité, des antagonistes ainsi que d'agents chimiothérapeutiques (doxorubicine,

témozolomide, carboplatine, carmustine et paclitaxel), les cellules ont été cultivées à confluence dans des plaques de 96 puits et le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu sans sérum. Les traitements aux antagonistes ou agents chimiothérapeutiques ont ensuite été faits et lus, par spectrophotomètre à 570 nm, tout comme les essais de prolifération (Brault *et al.* 2007; Bovenzi *et al.* 2010). Le pourcentage de densité optique obtenu, pour les cellules traitées relativement aux cellules contrôles (non traitées), a été utilisé pour déterminer les effets antiprolifératif et cytotoxique des différents composés testés.

### *Production de lentivirus et infection*

Des ARN en forme d'épingle à cheveux (shRNA) de vecteur d'expression de lentivirus contre rB2 ainsi que non ciblés (contrôle) (Sigma) ont été produits dans des cellules HEK 293T puis utilisés pour infecter des cellules MDA-MB-231 tel que décrit par le RNAi consortium of Broad Institute (Cambridge, MA, USA) ainsi que par le manufacturier (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada). Brièvement, les séquences de shRNA ont été élaborées et produites par Sigma-Aldrich puis envoyées au laboratoire sous forme de plasmides. Par la suite, des cellules HEK 293T ont été mises en culture ( $1.3-1.5 \times 10^5$  cellules/ml) dans des plaques de 6 cm avec 6 ml de milieu de culture faible en antibiotiques (DMEM 10% + iFBS + 0.1x Pen/Strep) et incubées pendant 24 h ou jusqu'à 70% de confluence (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Les cellules ont ensuite été transfectées avec les plasmides tel que recommandé par le fabricant et incubées pendant 18 h à 37°C. Le milieu de culture a ensuite été changé et remplacé par un milieu à haute teneur en FBS (30%) et réincubé 24 h à 37°C. Après 24 h d'incubation, le milieu a été récolté et remplacé par du milieu frais à haute teneur en FBS. Cette opération a été répétée 2-3 fois. Le milieu de culture obtenu a ensuite été centrifugé à 1250 rpm pendant 5 min puis le culot a été aliquoté et congelé pour usage ultérieur. Par la suite,  $1 \times 10^4$  cellules MDA-MB-231/puits ont été mises en plaque (96 puits) puis incubées à 37°C dans un incubateur avec 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à 70% de confluence. Le milieu de culture a ensuite été retiré et remplacé par du milieu frais contenant une concentration finale de 8 µg/ml de polybrène et incubé pendant 24h. Le milieu a de nouveau été changé et remplacé par du milieu contenant 2 µg/ml de puromycine. Les cellules ont été incubées ainsi jusqu'à l'apparition de colonies résistantes à la puromycine en changeant le milieu (contenant de la puromycine) tous les 3-4 jours. Des cellules

MDA-MB-231, exprimant de façon stable, le shRNA rB2 (shRNA1) ou non-ciblé (scrRNA) ont été obtenues après 10 jours de sélection avec la puromycine (2 µg/ml).

### *Sénescence*

Les effets des antagonistes rB2 sur la sénescence ont été étudiés à l'aide de kits commerciaux servant à la détection de l'expression de la  $\beta$ -galactosidase (Cell Signaling Technology, États-Unis). Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits à 500 000 cell/puits et sevrées de sérum juste avant l'expérience. Les cellules ont ensuite été traitées puis lavées dans du PBS et fixées dans 2 % de formaldéhyde et 0,2 % glutaraldéhyde, pendant 15 min, à température pièce. Une fois fixées, les cellules ont été lavées au PBS puis incubées à 37°C avec une solution fraîche de marquage de  $\beta$ -galactosidase (tampon sodium phosphate, pH 6,0, contenant 1 mg de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -d-galactopyranoside)/ml, 40mM d'acide citrique, 5mM de ferrocyanide de potassium, 15mM de NaCl, 2mM de MgCl<sub>2</sub>). Le marquage a été détecté par microscopie suivant une incubation de 18 h dans la solution de marquage. Le contrôle positif de sénescence utilisé consistait en des cellules endothéliales cérébrales porcines (CEMP fournies gracieusement par le Dr. S. Chemtob, Université de Montréal) sevrées de sérum pendant 48 h.

### *Fractionnement cellulaire*

La préparation de lysats cellulaires totaux et d'extraits membranaires et nucléaires a été réalisée comme décrit précédemment (Gobeil *et al.* 2003a; Gobeil *et al.* 2006b; Savard *et al.* 2008). Brièvement, les cellules ont été récoltées à confluence et lavées deux fois avec du HBSS chaud puis trypsinisées avec de la trypsine-EDTA 0,05 % ou du tampon de dissociation (Gibco, Life Technologies, Canada). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 800 g, pendant 7 min, à température pièce puis resuspendues dans du tampon de lyse hypotonique (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, inhibiteur de protéases) avant de les recentrifuger à 800 g, pendant 3 min, à 4°C (surnageant 1) suivi d'une incubation de 55 min sur glace et de l'ajout de NP40 (0,1 % v/v) pour 5 min. Les cellules ont ensuite été homogénéisées avec un homogénéisateur type Dounce puis centrifugées à 800 g, pendant 7 min à 4°C deux fois (surnageant 2), avant de vérifier la pureté des noyaux sous microscope à contraste de phase. Le surnageant de la deuxième

centrifugation a, quant à lui, été re-centrifugé d'abord à 10 000 g, pendant 15 min, à 4°C (pour centrifuger les mitochondries) (surnageant 3), puis à 200 000 g, pendant 60 min à 4°C (pour centrifuger les membranes) (surnageant 4). Les membranes ont ensuite été resuspendues dans du tampon phosphate contenant un inhibiteur de protéases. Les lysats totaux ainsi que les fractions membranaires et nucléaires ont été quantifiés par la méthode de BCA<sup>TM</sup> avec l'acide bicinchoninique, selon le protocole du fabricant (Pierce, États-Unis).

### *Cytométrie de flux*

Les cellules MDA-MB-231 ont été incubées sur glace avec agitation constante 20-25min dans du PBS avec 5% BSA avec ou sans 0,1% de saponine (pour la perméabilisation des cellules) puis l'anticorps primaire (LS-A797 ou AS276-83 pour rB2, AS434 ou RC72 pour rB1, anti-Kt ou anti-KHPM, 1: 500) a été ajouté au mélange et incubé de nouveau sur glace avec agitation constante pendant 1 h. Les cellules ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans un milieu PBS, 5% BSA avec ou sans 0,1% de saponine puis incubées avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplées à l'Alexa Fluor 488 (1: 300) sur glace dans la noirceur et avec agitation constante pendant 45-60 min. L'échantillon contenant la suspension cellulaire a été analysé par la suite avec un cytomètre FACScan (Becton Dickinson, États-Unis).

### *Étude de synergie*

Les études de relation de synergie ou de potentialisation toxique entre les antagonistes rB2 ou rB1 et les agents chimiothérapeutiques ont été évaluées par la méthode colorimétrique MTT en utilisant le logiciel Combosyn. 24 h après l'ensemencement, les cellules ont été traitées soit avec un antagoniste, un agent chimiothérapeutique ou une combinaison des deux, à des concentrations correspondant aux valeurs moyennes d'IC<sub>25</sub> de leur effet toxique pendant 72 h avant de procéder à l'essai MTT, tel que décrit plus haut. La synergie a été déterminée en calculant l'index de combinaison (CI) avec la formule :  $CI = (C_{A,X}/IC_{X,A}) + (C_{B,X}/IC_{X,B})$ , où C<sub>A,X</sub> et C<sub>B,X</sub> représentent la concentration du composé A et B respectivement utilisées en combinaison pour obtenir X% de l'effet. IC<sub>X,A</sub> et IC<sub>X,B</sub> représentent les concentrations nécessaires des composés seuls pour obtenir le même effet. Un CI de moins de 1 signifie une synergie alors qu'un CI égal à 1 représente un effet additif et un CI de plus de 1 une activité antagoniste.

## CHAPITRE 5

### Résultats

Ce chapitre présente les résultats obtenus lors de cette étude et est divisé en deux parties: la première comprend les résultats reliés à rB2, alors que la deuxième comprend ceux reliés à rB1. De plus, chacune des sections est séparées par objectif. L'ensemble des résultats des expériences contrôles se rapportant aux effets des vecteurs seuls soient le D-Tat, l'acide cholique et le lauryl a été volontairement omis pour alléger la présentation des résultats puisque ceux-ci se sont avérés inactifs aux plus fortes concentrations des peptides testés.

#### 1. Partie 1: rB2

**OBJECTIF 1** : Déterminer l'expression et la distribution subcellulaire des récepteurs des kinines chez des lignées tumorales de cancer du sein (dont une lignée de cancer du sein triple-négative) ainsi que dans des biopsies mammaires malignes humaines.

L'expression des rB2, de diverses lignées cellulaires tumorales de sein humain, a d'abord été établie par RT-PCR quantitatif, immunobuvardage et cytométrie de flux. Le Tableau 2 présente les caractéristiques des différentes lignées testées et la Figure 8 présente les résultats de RT-qPCR (A) et montre la présence du rB2 dans toutes les lignées testées. Le RT-qPCR montre également que la lignée MDA-MB-231 est l'une de celles qui présente la plus forte expression de rB2 avec une expression plus de trois fois supérieure à celle de la lignée contrôle MCF-10A, une lignée de cellules du sein non cancéreuse. Ces résultats sont appuyés par immunobuvardages (B), réalisés avec un contrôle de cellules épithéliales de glande mammaire, les HMEC. On observe une bande correspondant au poids moléculaire de rB2 chez toutes les lignées testées sauf la lignée contrôle. Ces résultats sont confirmés par la cytométrie de flux (C) où l'on remarque un déplacement variable des pics de fluorescence vers la droite chez toutes les lignées de cancer du sein indiquant la présence de rB2.

Tableau 2: Caractéristiques des différentes lignées mammaires utilisées dans cette étude.

Lignée	Type	Caractéristiques
MCF-10A	Glande mammaire	Cellules normales
T47D	Carcinome ductal	ER+, PR+, HER2/neu-
ZR-75-1	Carcinome ductal	ER+, PR-, HER2/neu-
MCF-7	Adénocarcinome	ER+, PR-, HER2/neu-
MDA-MB-231	Adénocarcinome	ER-, PR-, HER2/neu-

ER+ : exprime le récepteur à l'oestrogène; PR+ : exprime le récepteur à la progestérone; HER2/neu+ : exprime le récepteur de type 2 de l'EGF.

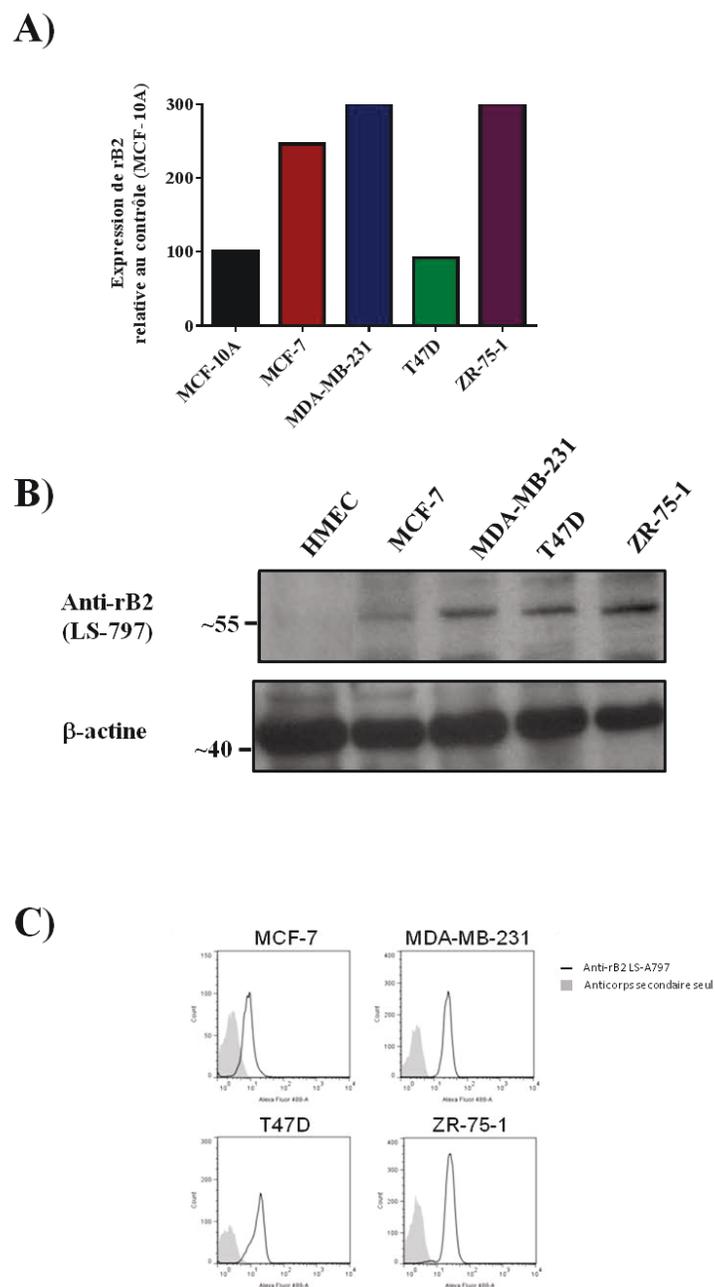


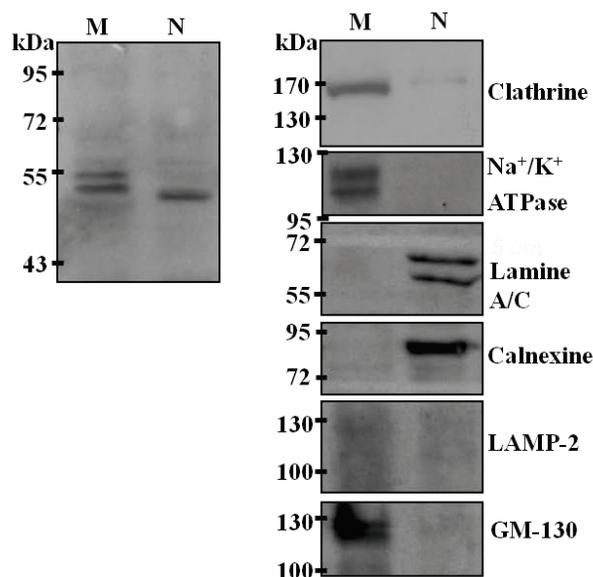
Figure 8: Expression de rB2 chez diverses lignées humaines de cancer du sein.

Détection des niveaux d'expression en ARNm par RT-qPCR (n=1) (A) et en protéine par immunobuvardage (B) et cytométrie de flux (C) de différentes lignées de cancer du sein. Les expériences d'immunobuvardage (lysats totaux) et de cytométrie de flux (cellules fixées/perméabilisées) ont été réalisées avec l'anticorps LS-A797 (LifeSpan). Le contrôle pour le RT-qPCR est la lignée mammaire saine MCF-10A et pour l'immunobuvardage un lysat total de HMEC (cellules mammaires épithéliales humaines). Les extraits protéiques de HMEC pour l'immunobuvardage ont été obtenus de ScienCell Research Laboratories. Pour la cytométrie de flux l'anticorps secondaire est un IgG de chèvre anti-lapin couplées à l'Alexa Fluor 488.

Suite à ces premiers résultats, nous avons choisi de poursuivre avec les MDA-MB-231 puisqu'il s'agit d'une lignée triple-négative, très agressive et difficile à traiter en plus d'exprimer fortement rB2. Nous avons donc déterminé la localisation subcellulaire des rB2 en commençant par faire du fractionnement cellulaire avec ces cellules suivi d'un immunobuvardage avec les fractions membranaire (M) (surnageant 4 de la section Matériel et méthode) et nucléaire/intracellulaire (N) (noyaux purifiés et resuspendus; surnageant 2). Les résultats obtenus montrent la présence de rB2 dans la fraction membranaire et nucléaire/intracellulaire (Figure 9, A). La double bande observée, dans la fraction membranaire, pourrait être due à un niveau de glycosylation différent. De plus, les divers contrôles réalisés confirment la pureté de nos fractions puisque la clathrine, qui est une protéine structurelle de la membrane plasmique, se retrouve surtout dans la fraction membranaire. La pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase se retrouve uniquement dans la fraction membranaire, contrairement à la lamine A/C, une protéine structurelle du noyau, qui est retrouvée uniquement dans la fraction nucléaire tout comme la calnexine. L'absence des protéines Lamp-2 et GM-130, des marqueurs des lysosomes et du Golgi, respectivement, dans la fraction nucléaire témoigne également de la bonne pureté des préparations des noyaux isolés des cellules MDA-MB-231.

Les résultats obtenus en immunobuvardage sont également confirmés par cytométrie de flux à l'aide de l'antisérum AS-276-83 dirigé contre plusieurs épitopes extra- et intracellulaires des rB2 (Figure 9, B). En utilisant cette dernière approche chez les cellules MDA-MB-231 non-perméabilisées, nous avons pu établir la présence d'une faible population de rB2 à la membrane plasmique comme l'indique le déplacement de type dextre de la courbe d'intensité de fluorescence par rapport au contrôle basé sur l'utilisation de l'anticorps secondaire seul (Figure 9, B panneau de gauche). Toutefois, un marquage plus important avec le même antisérum a été observé chez les cellules perméabilisées indiquant la détection d'un grand nombre de rB2 intracellulaires (Figure 9, B, panneau du centre). Pour tester la localisation nucléaire des rB2, nous avons refait les tests en cytométrie de flux avec des préparations de noyaux intacts fraîchement isolés (Figure 9, B, panneau de droite). Nous avons ainsi pu observer un marquage nucléaire spécifique et important des rB2 dans les cellules MDA-MB-231. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un autre anticorps anti-rB2 spécifique, soit le LS-A797 reconnaissant un épitope dans la partie C-terminale du rB2 (Figure 9, B, panneau de droite).

A)



B)

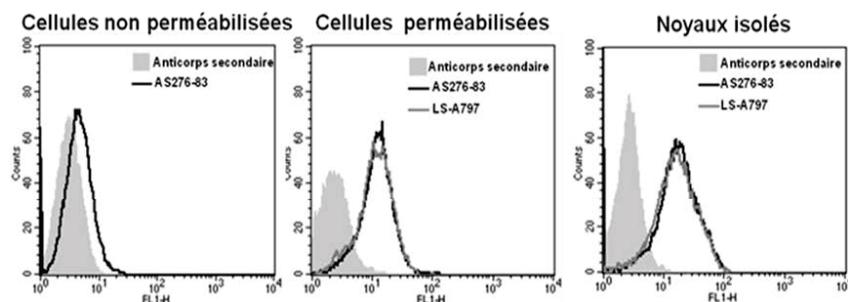


Figure 9: Localisation subcellulaire de rB2 chez les MDA-MB-231.

L'immunobuvardage (A) et la cytométrie de flux (B) indiquent la présence des rB2 à la membrane plasmique (M) et dans la région nucléaire (N). Les expériences ont été réalisées avec deux anticorps différents anti-rB2 spécifiques soient l'AS-276-83 et LS-A797. Pour la cytométrie de flux, l'anticorps secondaire est un IgG de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 488.

En plus de la présence de rB2, dans le compartiment nucléaire, nous avons également testé la présence des autres composantes du SKK telles que le précurseur des kinines, le kininogène ainsi que la kallibréine dans le cytoplasme de MDA-MB-231. Nous avons ainsi pu établir non seulement la présence des kininogènes (KHPM et/ou KFPM) et de la kallibréine tissulaire (Kt) à l'intérieur des cellules par cytométrie de flux (Figure 10, A) mais également une colocalisation de ces deux composantes dans le cytoplasme des cellules grâce à la microscopie confocale (Figure 10, B). Finalement, nous avons aussi pu détecter la présence de BK à l'intérieur de cellules (Figure 10, C), supportant l'hypothèse que le SKK soit actif dans les cellules MDA-MB-231.

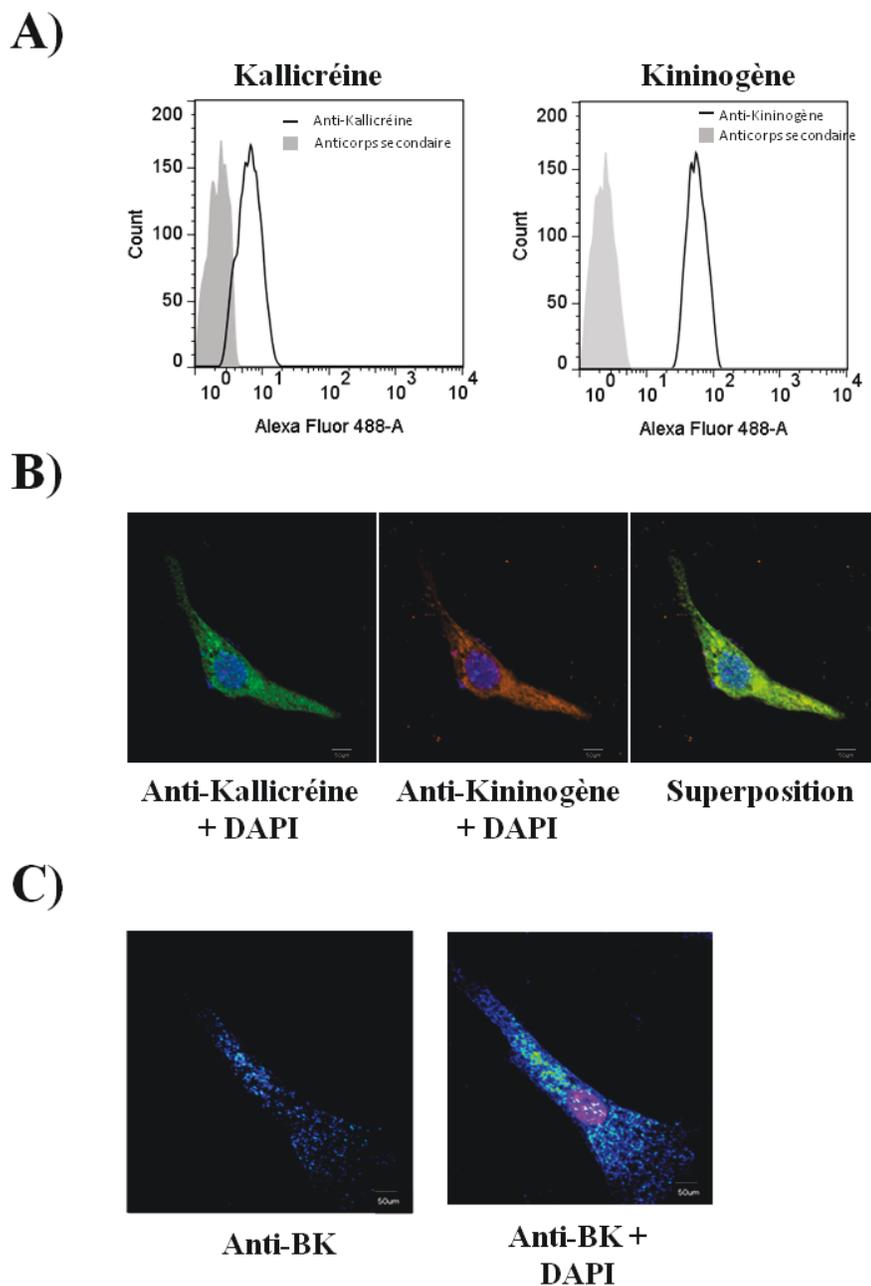
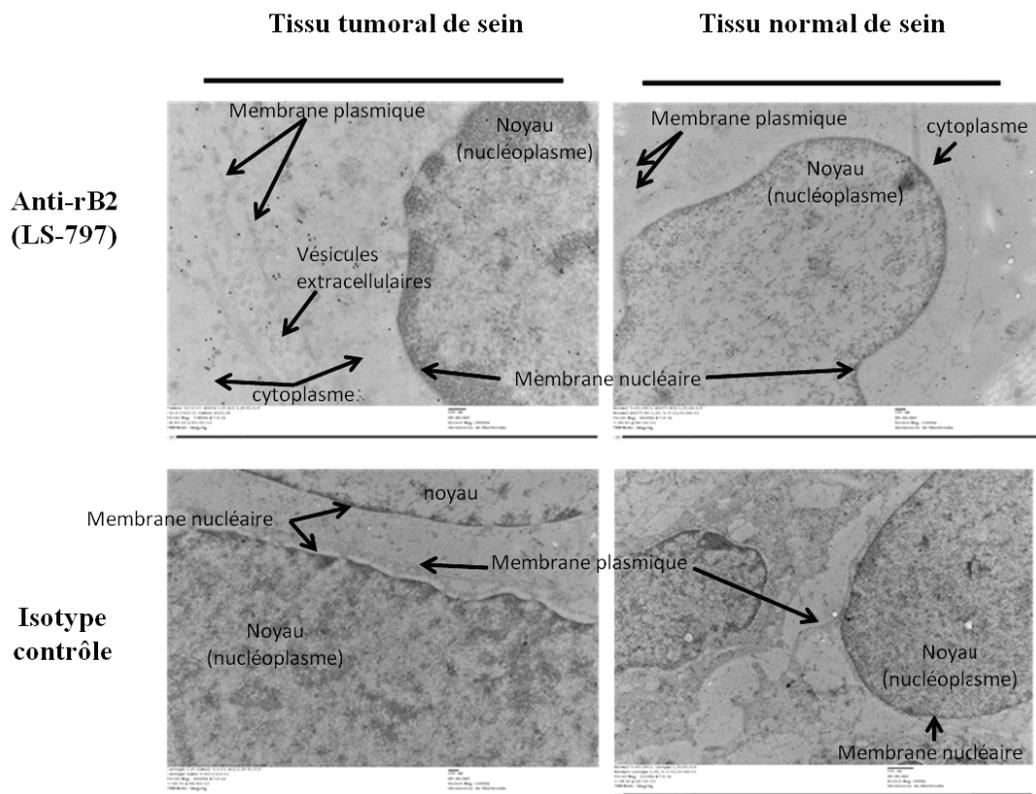


Figure 10: Présence cytoplasmique de certaines composantes du SKK dans les cellules MDA-MB-231.

Présence du KHPM et du KFPM ainsi que de la Kt en cytométrie de flux (A) sur des cellules perméabilisées et microscopie confocale (B) et de son ligand, la BK (C) chez les MDA-MB-231. Les noyaux sont marqués au DAPI (en bleu). Cytométrie de flux: l'anticorps secondaire est un IgG de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 488. Microscopie confocale: les anticorps secondaires sont l'Alexa Fluor 568® âne anti-chèvre ainsi que l'Alexa Fluor 488® chèvre anti-lapin. Les figures en B) ainsi que celle de gauche en C) représentent un seul plan focal alors que celle de droite en C) représente une reconstitution de plusieurs plans focaux (z-stack).

Finalement, après avoir démontré la localisation intracellulaire/nucléaire de rB2 chez la lignée cellulaire de TNBC MDA-MB-231, nous avons voulu comparer ces résultats avec des échantillons cliniques en établissant la distribution subcellulaire de rB2 dans des biopsies humaines de cancer du sein triple-négatif, par immunomarquage à l'or en microscopie électronique à transmission (Figure 11, A). On a pu détecter la présence et la distribution des rB2 dans la membrane plasmique, le cytosol de même que le noyau cellulaire (incluant l'enveloppe et le nucléoplasme) dans le tissu tumoral et le tissu normal. Par contre, on distingue bien une expression plus grande de rB2 dans le tissu tumoral comparativement au tissu normal, résultat confirmé par la quantification (Figure 11, B) de rB2 au noyau et dans le cytoplasme où la présence de rB2 est trois à quatre fois plus importante dans le spécimen tumoral comparativement au spécimen normal.

A)



B)

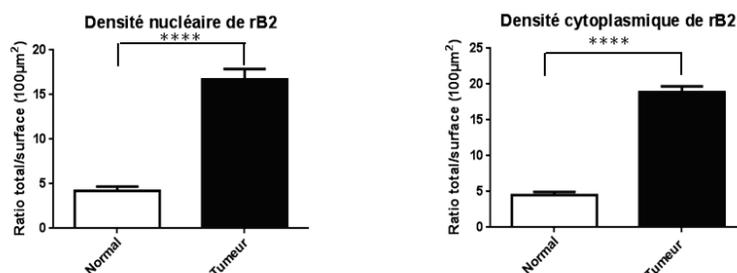


Figure 11: Localisation subcellulaire de rB2 chez des spécimens cliniques de cancer du sein triple-négatif.

La microscopie électronique (A) montre la répartition de rB2 dans un tissu normal (panneau du haut à droite) et de cancer du sein (panneau du haut à gauche) dans un spécimen clinique (biopsie) de cancer du sein triple-négatif comparativement au contrôle (isotype contrôle). La quantification (B) de la densité de rB2 au noyau et dans le cytoplasme a également été faite. La quantification a été réalisée avec le programme Image J (National Institute of Health, JAVA 1.60\_02). Une moyenne de 10 à 15 cellules couvrant une surface d'un minimum de  $200\mu\text{m}^2$  par échantillon a été analysée générant environ 50 images d'une magnification allant de 40 000 x à 60 000 x. Dilution des anticorps: anticorps primaire 1:25 et anticorps secondaire 1:20. Quantification: test T de Student non païré avec \*\*\*\*  $p < 0.0001$  comparativement au contrôle.

*OBJECTIF 2: Développer et caractériser de nouveaux antagonistes perméants pour l'étude des fonctions des rB2 intracellulaires/nucléaires.*

Les structures des antagonistes perméants et non perméants utilisés pour cet objectif sont montrées à la Figure 12, alors que les caractéristiques pharmacologiques sont résumées dans le Tableau 3. Nous avons utilisé un antagoniste rB2 bien connu dans la littérature, vraisemblablement non perméant, soit le Hoe 140, que nous avons couplé à un peptide pénétrant (D-Tat) ou à un vecteur lipidique, l'acide cholique, pour ainsi tenter de créer deux antagonistes perméants soit le NG68 et le NG134, respectivement. Finalement, nous avons aussi utilisé le FR173657, un autre antagoniste bien connu de la littérature mais non peptidique.

Le Tableau 3 indique que le NG68 et le NG134 sont perméants tel que le montre l'incorporation cellulaire rapide de ces deux composés contrairement au Hoe 140 qui ne présente aucune incorporation et ce même après 24h. Le FR173657 présente lui aussi une incorporation cellulaire très rapide. Le Log D (pH 7.4) peut être prédictif de la perméabilité d'un composé. En effet, les composés ayant une valeur de log D entre 0 et 3 sont généralement des composés hautement perméables. Les valeurs positives de Log D mesurées pour les antagonistes FR173657 et NG134 indiquent que ces composés peuvent passer directement à travers des membranes cellulaires, ce qui est en accord avec les données d'incorporation de ces agents mesurées en LC-MS/MS. La valeur négative de Log D pour l'antagoniste peptidique NG68 reflète potentiellement une voie d'entrée qui ne dépend pas d'un mécanisme de diffusion passive.

On peut également constater que les antagonistes NG68 et NG134 ont des propriétés pharmacologiques (affinité, puissance) assez semblables à celles de la molécule mère Hoe 140 (Tableau 3).

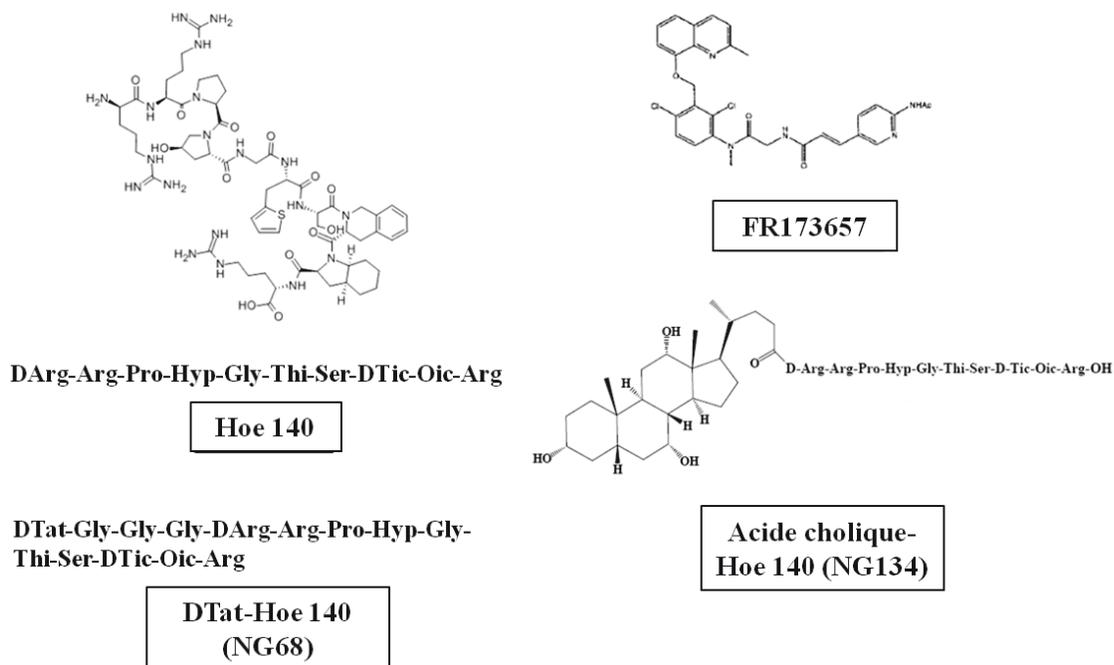


Figure 12: Structures chimiques des antagonistes rB2 utilisés dans le cadre de ce projet. Le NG68, le NG134 et le Hoe 140 (originellement de Hoechst, Marion et Roussel maintenant Sanofi-Aventis) ont été synthétisés dans le laboratoire du Pr. Gobeil alors que le FR173657 est un don de la compagnie Fusijawa Co.

Tableau 3: Caractéristiques pharmacologiques et physicochimiques des antagonistes rB2 des kinines utilisés dans le cadre de ce projet.

Agents	HEK293T	VOH	LogD n-octanol/PBS (pH 7.4)	Incorporation cellulaire (pmol/10 <sup>6</sup> cellules)		
	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)		15 min	4 h	24 h
Hoe 140	5.3 ± 1.7	3.8 ± 0.3	-3.06 ± 0.10	0	0	0
FR173657	37.0 ± 1.6	6.0 ± 0.8	2.89 ± 0.33	116 ± 19	139 ± 25	185 ± 48
NG68	5.2 ± 1.0	18.0 ± 4.0	-3.02 ± 0.15	5 ± 4	14 ± 3	21 ± 4
NG134	19.0 ± 6.5	6.5 ± 2.5	0.21	13 ± 2	22 ± 2	63 ± 11

Les valeurs représentent la moyenne de deux expériences indépendantes ± SEM. L'incorporation cellulaire des antagonistes rB2 chez des cellules de MDA-MB-231 a été déterminée par l'ajout de l'antagoniste à une concentration non toxique (2.5µM).

**OBJECTIF 3:** Déterminer *in vitro* les effets des antagonistes rB2 perméants et non-perméants sur la prolifération et l'induction de l'apoptose des cellules MDA-MB-231.

Le premier test que nous avons fait avec les antagonistes perméants et non perméants de rB2 est un test de clonogénicité pour vérifier si nos antagonistes rB2 entraînent une diminution du potentiel de clonogénicité chez les MDA-MB-231. Les résultats montrent que les antagonistes perméants de rB2, FR173657, NG68 et NG134, entraînent une diminution du nombre de colonies formées (Figure 13, A). Par contre, l'antagoniste non perméant Hoe 140 n'a pas montré d'effet sur le potentiel de clonogénicité comparativement au contrôle. Fait étonnant, lorsque nous avons testé les agonistes de rB2 soient la BK qui est non perméante ainsi que le NG106 qui est une version perméante de BK (lié au D-Tat), nous avons pu remarquer une augmentation de la grosseur des colonies mais pas du nombre de colonies avec le NG106, alors que la BK n'a pas eu d'effet ni sur la grosseur ni sur le nombre et ce jusqu'à des concentrations de 100 $\mu$ M (Figure 13, B).

Nous avons aussi testé les effets des antagonistes rB2 sur le potentiel de clonogénicité des MDA-MB-231 en milieu semi-solide (agar mou). Les résultats obtenus se sont avérés très semblables à ceux obtenus précédemment, c'est-à-dire que les antagonistes perméants diminuent le nombre de colonies formées tandis que l'antagoniste non perméant ne présente aucun effet (Figure 13, C).

Dans le but de confirmer que la diminution du nombre de colonies obtenue était bien due aux récepteurs intracellulaires/nucléaires, nous avons refait des tests de clonogénicité en bloquant d'abord les récepteurs de surface avec une concentration saturante (10  $\mu$ M) de Hoe 140. Cette expérience nous a permis de démontrer que le blocage des rB2 de surface n'empêche aucunement l'action des antagonistes perméants ni de l'agoniste perméant. De plus, l'ajout de l'agoniste perméant NG106 contrecarre ou inhibe les effets antiprolifératifs du FR173657 et du NG68 supportant ainsi l'implication des rB2 dans ce phénomène (Figure 13, D).

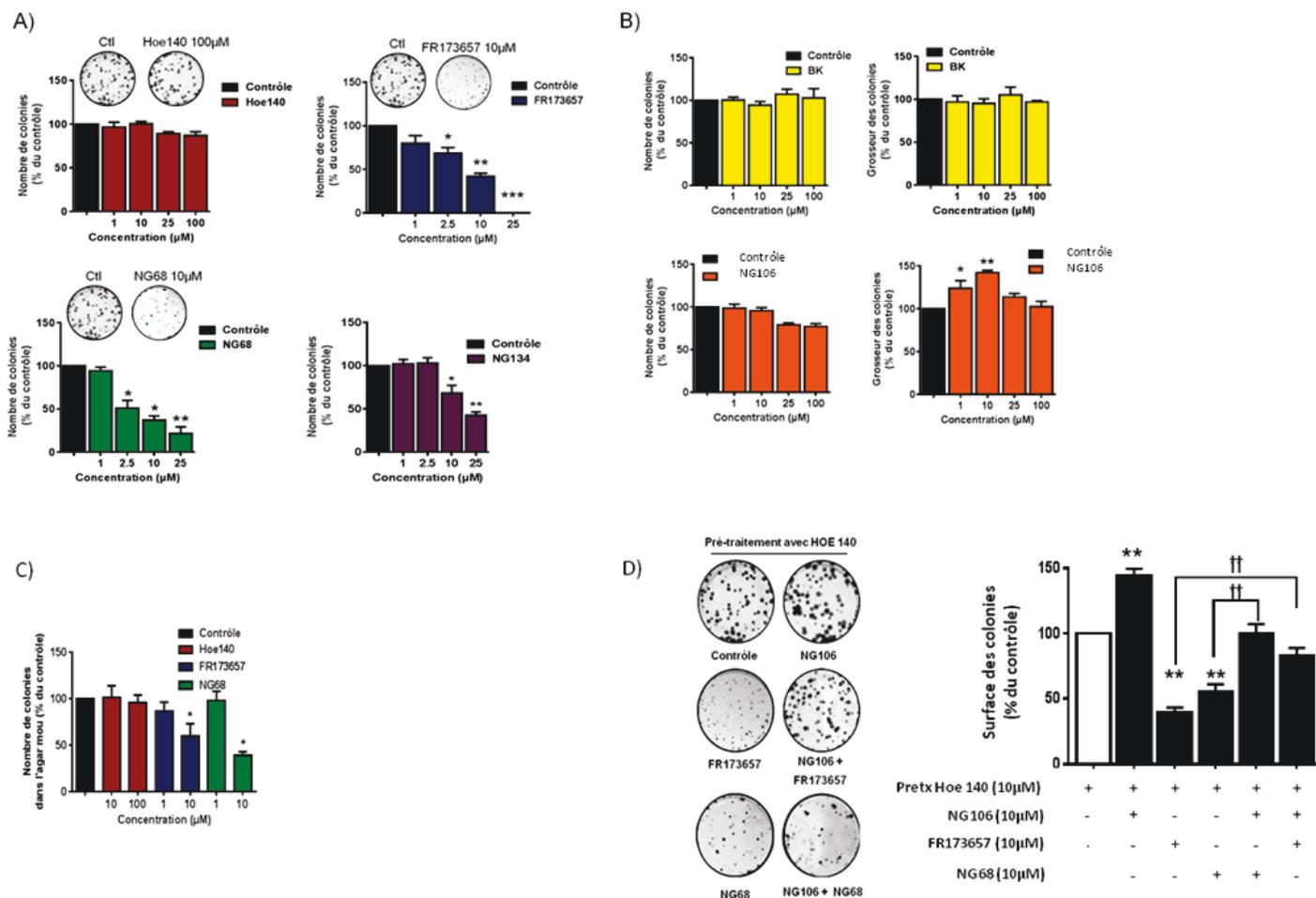


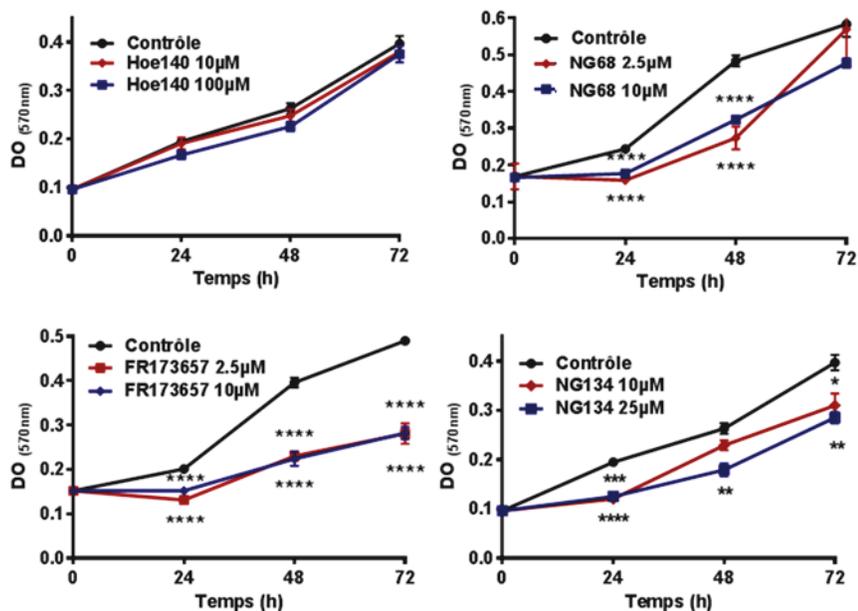
Figure 13: Effets des antagonistes et agonistes de rB2 sur le potentiel clonogénique des cellules MDA-MB-231.

Les essais de clonogénicité montrent les effets des antagonistes (A) et des agonistes (B) de rB2 sur le potentiel de clonogénicité suivant un traitement de 14 jours à 37°C. Les résultats des essais de clonogénicité en agar mou (durée totale de traitement environ 28 jours) (C) ainsi que ceux réalisés sur cellules adhérentes avec un blocage préalable des rB2 de surface avec le HOE 140 (10 μM, 15 min avant le début du traitement) (D) sont présentés. Les contrôles représentent des cellules non traitées mais mise dans les mêmes conditions que celles traitées et ce pour la durée de l'expérience. Les images ont été analysées avec Image Pro Plus et les données représentent la moyenne ± SEM de 4-8 expériences avec \*  $p < 0.05$  et \*\*  $p < 0.01$  comparativement au contrôle selon un test ANOVA couplé à un test de Dunnett pour les essais clonogéniques et d'agar mou. Pour les tests de blocage: \*\*  $p < 0.01$  vs le contrôle (Hoe 140 seul), ††  $p < 0.01$  entre les deux groupes selon un test T de student non païré.

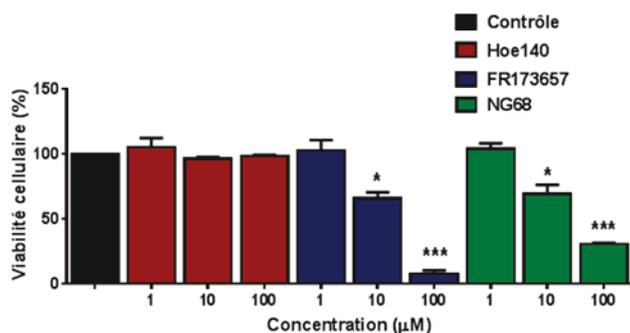
Nous avons ensuite poursuivi avec des essais de prolifération en MTT, pour mesurer les effets des antagonistes de rB2, sur la prolifération des cellules MDA-MB-231 à sous confluence. Les résultats obtenus, lors de ces essais, concordent avec ceux obtenus avec les essais de clonogénicité. En effet, ici aussi les antagonistes montrent une diminution de la prolifération, et ce, à des concentrations aussi petites que 2,5 $\mu$ M pour NG68 et FR173657. Le NG134 s'avère un peu moins efficace puisqu'une concentration de 10 $\mu$ M est nécessaire pour obtenir une diminution significative mais tous les antagonistes perméants testés montrent un effet négatif sur la prolifération alors que le Hoe 140 ne provoque aucune diminution significative, et ce, même à 100 $\mu$ M (Figure 14, A).

En plus des effets sur la prolifération, nous avons également testé en essais MTT, les effets cytocides ou cytotoxiques des antagonistes rB2 (Figure 14, B). L'essai de la viabilité cellulaire, par MTT, est très similaire à celui de prolifération sauf qu'il est réalisé avec des cellules à confluence et sans FBS dans le milieu de culture de manière à placer les cellules en mode quiescentes (arrêt de prolifération). Les résultats obtenus ont montré que, contrairement au Hoe 140, tous les antagonistes perméants peuvent diminuer la viabilité des cellules MDA-MB-231 de façon concentration dépendante (Figure 14, B). De plus, nous avons refait les tests MTT sur les cellules HEK 293T, une lignée de cellules embryonnaires de rein humain n'exprimant pas ou très peu de rB2 (Bélanger *et al.* 2009) pour contrôler la spécificité d'action de l'antagoniste FR173657. À la Figure 14, C, on peut effectivement constater que cet antagoniste n'a aucun effet cytotoxique sur cette lignée cellulaire, contrairement aux cellules MDA-MB-231 (Figure 14, B).

A)



B)



C)

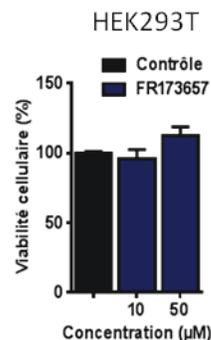


Figure 14: Effets des antagonistes rB2 perméants sur la prolifération et la viabilité cellulaire des cellules MDA-MB-231.

L'effet des antagonistes rB2 sur la prolifération (A) et la viabilité cellulaire (B) des MDA-MB-231 ainsi que des HEK-293T (C) a été déterminé par des essais MTT. Les essais de prolifération cellulaire ont été réalisés aux temps et aux concentrations indiqués dans du milieu de culture avec 10% de sérum (2000cell/puits, 96 puits) alors que le temps d'incubation pour tous les essais de viabilité cellulaire était de 72h dans du milieu sans sérum avec des cellules confluentes. À la fin des essais, les cellules ont été incubées avec la solution de MTT (0,25 mg/ml) pendant 1h30 avant d'être solubilisées dans une solution d'isopropanol : HCl 1 :25. Les contrôles représentent des cellules ayant été mises dans les mêmes conditions que les celles traitées mais sans aucun traitement. Les résultats représentent n=6-8 puits par condition avec un test ANOVA couplé à un Dunnett où \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 et \*\*\*\* p<0.0001.

Puisque les antagonistes rB2 perméants exercent à la fois des effets cytostatiques et cytotoxiques, nous avons voulu savoir si l'apoptose était impliquée dans le processus. Nous avons donc fait de la cytométrie de flux (avec marquage à l'Annexine V et iodure de propidium) pour le déterminer. Les résultats obtenus montrent que les antagonistes perméants augmentent l'apoptose précoce et tardive/nécrose comparativement à l'antagoniste non perméant qui n'a pas d'effet significatif sur l'apoptose (Figure 15, A). De plus, cette augmentation de l'apoptose est bel et bien spécifique à rB2 puisque lorsque le même test est fait sur des COS-1, qui sont des fibroblastes de rein de singe n'exprimant pas de rB2, les antagonistes perméants ne modulent pas l'apoptose de ces cellules (Figure 15, B). Toutefois, même si les antagonistes perméants provoquent une augmentation de l'apoptose chez les MDA-MB-231, ils ne semblent pas avoir d'effet sur la sénescence de ces dernières comme l'indique la Figure 15, C. En effet, on ne détecte pas la présence de  $\beta$ -galactosidase (bleu) révélant des cellules sénescents chez les cellules, qui ont été traitées avec les antagonistes rB2 perméants, comme c'est le cas pour le contrôle positif (pCMVEC- FBS).

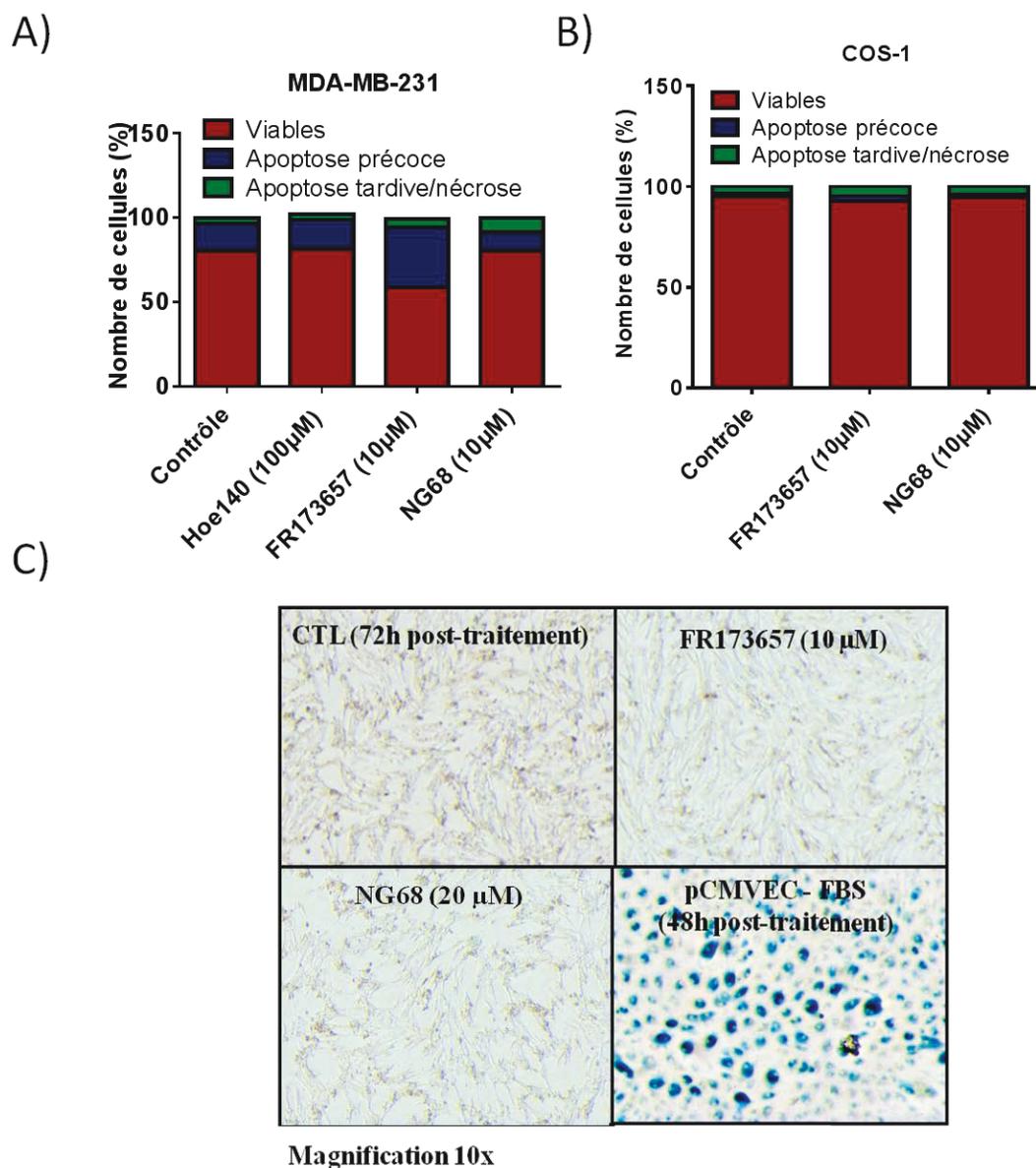


Figure 15: Effets des antagonistes rB2 perméants sur l'induction de l'apoptose et de la sénescence chez des cellules MDA-MB-231 et COS-1.

L'incidence d'apoptose a été évaluée par cytométrie de flux chez des MDA-MB-231 (A) et des COS-1 (B) confluentes traitées avec des antagonistes rB2 pendant 24 h dans du milieu sans sérum et marquées à l'Annexine-V et l'iodure de propidium. L'intensité de fluorescence fut analysée avec le logiciel CellQuest. Un test de sénescence (traitement de 48h) a aussi été réalisé dont des images types de microscopie de contraste de phase (C) montrent les effets des antagonistes rB2 (panneaux du haut à droite et du bas à gauche) sur la sénescence des MDA-MB-231 comparativement aux cellules endothéliales de cerveau de porc (milieu sans sérum) qui servent de contrôle positif (panneau du bas à droite). Les contrôles représentent des cellules non traitées mais mise dans les mêmes conditions que celles traitées pendant toute la durée de l'expérience. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences.

Étant donné que les antagonistes perméants diminuent la prolifération cellulaire et induisent l'apoptose, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation modulées par ces mêmes antagonistes. Nous avons donc fait des essais préliminaires par immunobuvardage en ciblant différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération (ex. Akt, MAPK p42/p44, p38, p27) et la survie cellulaire (ex. Bcl-2, Bad, XIAP). Un traitement des cellules MDA-MB-231 avec les antagonistes pendant 24h a révélé qu'aucun de ceux-ci n'a d'effets modulateurs sur l'expression des protéines totales des voies Akt, p38 et Bcl-2 (Figure 16, A). Par contre, nous avons noté une diminution des taux d'expression de protéines totales des MAPK p42/p44, de la cycline A et de la molécule anti-apoptotique XIAP en réponse au traitement avec le FR173657; le NG68 semble aussi diminuer l'expression des MAPK p42/p44 ainsi que celle de la cycline A légèrement (Figure 16, A). Les résultats semblent aussi montrer que le FR173657 et le NG68 augmentent tous deux les niveaux d'expression de la protéine pro-apoptotique Bad (Figure 16, A). De plus, FR173657 et NG68 entraînent une augmentation de l'expression de p27<sup>kip1</sup>, ce qui n'est pas le cas du Hoe 140 (Figure 16, B).

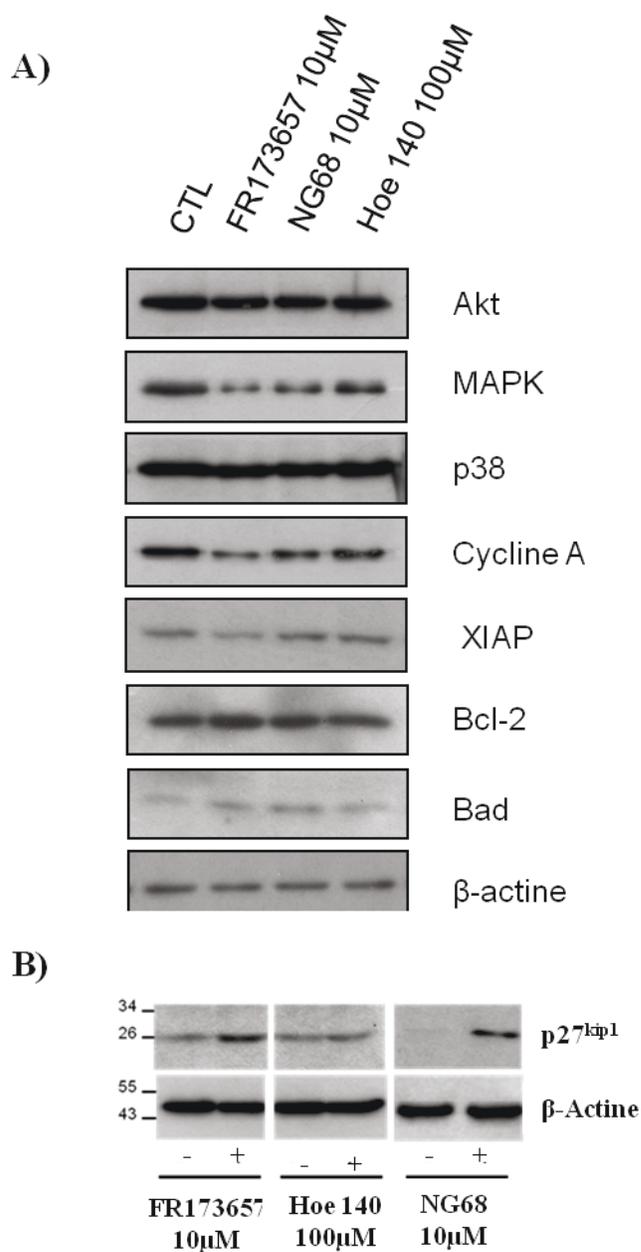


Figure 16: Effets des antagonistes rB2 perméants sur diverses voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et le cycle cellulaire.

L'analyse de l'expression protéique en immunobuvardage a été réalisée sur des lysats protéiques totaux extraits de cellules MDA-MB-231 préalablement traitées ou non avec les antagonistes rB2 pendant 24 heures à 37°C (A) ainsi que sur p27<sup>kip1</sup> (B).

Suivant ces résultats, des études cinétiques de temps courts (0-60 min) de l'activité de kinases Akt, JNK et MAPK p42/44, modulées par phosphorylation, ont été réalisées chez les cellules MDA-MB-231 incubées ou non avec les antagonistes rB2. Ces études ont produit des résultats mitigés et inconstants (résultats non montrés); sauf pour la kinase p38, où l'on a pu observer une augmentation de sa phosphorylation suite aux traitements des cellules avec le FR173657 et le NG68 (Figure 17, A). Différents groupes de recherche ont démontré un lien entre p38 et p27<sup>kip1</sup> chez plusieurs lignées cellulaires normales et cancéreuses (Hossain *et al.* 2012; Liontos *et al.* 2010; Pillai et Shivakuma 2011; Swat *et al.* 2011). Nous avons donc choisi de tester la régulation de l'expression de p27<sup>kip1</sup> par la kinase p38 activée en réponse aux traitements avec les antagonistes perméants (Figure 17, B). Nous avons refait des essais d'immunobuvardage de la protéine p27<sup>kip1</sup> chez les cellules pré-incubées (6 heures) avec le composé SB203580, un inhibiteur de p38 (Figure 17, C). Nos résultats ont montré que l'inhibiteur de p38 joue un rôle dans la diminution de la présence de p27<sup>kip1</sup> stimulé par le FR173657 et le NG68, et semblent donc en accord avec la fonction majeure de cette voie dans le contrôle de protéines à fort effet antiprolifératif. Dans le but d'étudier et de valider l'implication de p38 dans les effets antiprolifératifs des composés FR173657 et NG68, nous avons ensuite refait les tests de clonogénicité et de prolifération en prétraitant d'abord les cellules avec le SB203580 (Figure 17, D). Les résultats obtenus montrent que le SB203580 diminue bien et de manière significative les effets antiprolifératifs induits par les agents FR173657 et NG68. Ces derniers résultats viennent appuyer la pertinence des résultats de la Figure 16 et donnent un crédit particulier à p38 MAPK dans la transmission des effets anticancéreux des antagonistes rB2 perméants.

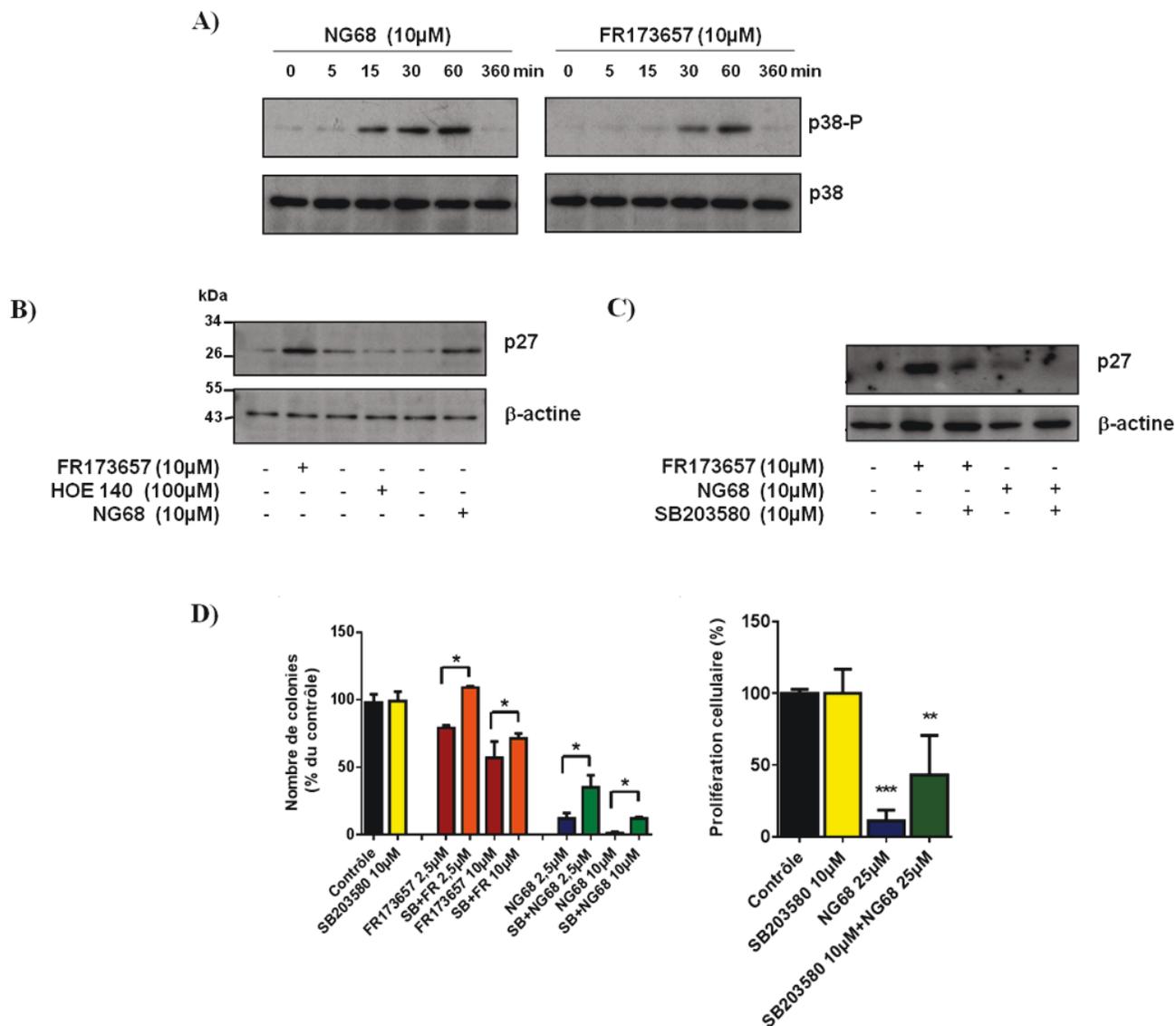


Figure 17: Implication de la voie de p38 MAPK et p27<sup>kip1</sup> dans les effets anti-clonogéniques et antiprolifératifs des antagonistes rB2 chez les cellules MDA-MB-231.

L'immunobuvardage montre l'implication de la voie de p38 MAPK (A) et l'induction de l'expression de p27<sup>kip1</sup> (B) par les antagonistes perméants rB2. Les cellules (à 70-80% de confluence) mis dans un milieu DMEM sans sérum ont été traitées avec un antagoniste rB2 pendant 24 h à 37°C. L'utilisation de l'inhibiteur de p38 SB203580 (10  $\mu$ M, pré-incubation de 6 h, 37°C avant le traitement aux antagonistes) confirme l'implication de cette voie (C) dans le mode d'action de ces derniers. Les essais de clonogénicité (D, gauche) et de prolifération en MTT (D, droite) avec le même inhibiteur de p38 indiquent également son implication dans ces phénomènes (incubation de 72h, 37°C). Les contrôles représentent des cellules non traitées mais mise dans les mêmes conditions que celles traitées pendant toute la durée de l'expérience. Les essais clonogéniques ont été analysés par Image Pro Plus. Les résultats représentent n=6-8 puits par condition avec un test ANOVA couplé à un test de Dunnett où \*p<0.05, \*\*p<0.01 et \*\*\*p<0.001.

Suite à ces résultats encourageants, nous avons voulu évaluer et comparer l'efficacité relative de nos antagonistes rB2 perméants par rapport aux agents de chimiothérapie utilisés en clinique pour le traitement du cancer du sein (Tableau 4) en l'occurrence, le temozolomide, la carboplatine, la carmustine, la doxorubicine et le paclitaxel. Pour ce faire, nous avons déterminé l'activité anticancéreuse ou cytotoxique (exprimée en  $IC_{50}$ ) des divers agents par la méthode MTT (Tableau 4). Nous avons ainsi déterminé que certains de nos antagonistes perméants (FR173657 et NG68) possédaient des valeurs  $IC_{50}$  comparables et parfois même inférieures aux agents de chimiothérapie. En effet, de tous les agents chimiothérapeutiques testés, seuls la doxorubicine et le paclitaxel ont présenté des valeurs d' $IC_{50}$  inférieures aux antagonistes FR173657 et NG68 (Tableau 4). Puisque certains agents cytotoxiques sont parfois utilisés en combinaison dans le traitement du cancer du sein, nous avons réalisé des essais MTT avec nos antagonistes rB2 en combinaison avec certains agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine et le paclitaxel, dans le but de déterminer la présence de synergie entre ces composés (Tableau 5). Nous avons ainsi pu déterminer grâce au logiciel Compusyn qu'il y avait une synergie d'action entre le NG68 et la doxorubicine (CI de 0,572). De la même manière, on a pu déceler une synergie d'action entre le FR173657 et la doxorubicine (CI de 0,12) ainsi que le paclitaxel (CI de 0,785) (Tableau 5).

Tableau 4: Comparaison des activités cytotoxiques des antagonistes rB2 avec des agents chimiothérapeutiques utilisés en clinique dans le traitement du cancer du sein.

Agents	IC <sub>50</sub>
Hoe 140	> 100 μM
FR173657	20 ± 1 μM
NG68	45 ± 1 μM
NG134	> 100 μM
BCNU (Carmustine)	62 ± 1 μM
Doxorubicine (Adriamycin)	2 ± 1 μM
Carboplatine	> 100 μM
Temozolomide (Temodar)	> 100 μM
Paclitaxel (Taxol)	10 ± 1 μM

La viabilité des cellules MDA-MB 231 a été établie par la méthode MTT après un traitement de 72 h à 37°C. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ont été calculées à partir de courbes concentration-réponse complètes variant de 0% à 80-100% de mort cellulaire (n=6-8).

Tableau 5: Synergie entre les antagonistes perméants rB2 et des agents chimiothérapeutiques commerciaux.

Antagoniste	Agent chimiothérapeutique	CI
NG68 (20μM)	Doxorubicine (1μM)	0,42
NG68 (20μM)	Paclitaxel (5μM)	1,14
FR173657 (10μM)	Doxorubicine (1μM)	0,12
FR173657 (10μM)	Paclitaxel (5μM)	0,79

Essais MTT: 24h après l'ensemencement, les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec un antagoniste, un agent chimiothérapeutique ou une combinaison des deux. Pour les tests de combinaison, les cellules ont été traitées à l'IC<sub>25</sub> des antagonistes/agents chimiothérapeutiques pendant 72h à 37°C (n=6-8). La synergie a été déterminée en calculant l'index de combinaison (CI) selon la formule :  $CI = (C_{A,X}/IC_{X,A}) + (C_{B,X}/IC_{X,B})$ , où  $C_{A,X}$  et  $C_{B,X}$  représentent la concentration du composé A et B respectivement utilisées en combinaison pour obtenir X% de l'effet. IC<sub>X,A</sub> et IC<sub>X,B</sub> représentent les concentrations nécessaires des composés seuls pour obtenir le même effet. Valeurs de CI: 0-0.1=synergie très forte, 0.1-0.3=synergie forte, 0.3-0.7= synergie, 0.7-0.85=synergie moyenne, 0.85-0.9=synergie faible, 0.9-1.1=presque additif et plus de 1.1= antagonistes faibles à moyens.

**OBJECTIF 4** : Déterminer *in vitro* l'impact de l'inactivation du gène du rB2 des kinines (knockdown) sur la prolifération et la viabilité des cellules MDA-MB-231.

Puisque notre hypothèse de départ était que les rB2 ont un impact sur la prolifération et la maintenance de la viabilité cellulaire, nous avons créé une lignée de MDA-MB-231 dans laquelle nous avons inactivé le gène de rB2 (knockdown) dans le but de vérifier cette hypothèse. Nous nous sommes d'abord assuré que rB2 avait bel et bien été inactivé dans notre lignée cellulaire que nous avons nommée shRNA1. Dans le but de s'assurer que la procédure d'inactivation en soi (shRNA) n'avait aucun impact sur les cellules, nous avons créé en parallèle un knockdown contrôle avec un shRNA dit «scrambled» ou contrôle qui ne cible pas l'ARNm rB2 (nommé ScrRNA). Nous avons vérifié le niveau d'expression de rB2 dans nos deux lignées par RT-qPCR (Figure 18, A), cytométrie de flux (Figure 18, B) et immunobuvardage (Figure 18, C). Les deux premières méthodes valident la diminution de l'expression de rB2 dans la lignée inactivée (shRNA1) mais non dans la lignée contrôle (ScrRNA) et les résultats de l'immunobuvardage confirment cette diminution autant dans les fractions des protéines nucléaires que membranaires.

Pour valider notre hypothèse de départ à savoir que le rB2 joue un rôle dans la prolifération des cellules tumorales du cancer du sein, nous avons comparé la vitesse de prolifération des cellules déplétées en rB2 à celle de la lignée contrôle à l'aide de l'essai MTT (Figure 18, D et E). Nous avons effectivement pu observer qu'il y avait une diminution significative dans la vitesse de prolifération de cellules knockdown rB2 comparativement aux cellules contrôles (Figure 18, D). Nous avons également fait des tests de clonogénicité sur ces deux lignées cellulaires pour vérifier si l'inactivation partielle de rB2 avait aussi un impact sur cet aspect des cellules tumorales. Tel qu'illustré à la Figure 18, E, l'inactivation du gène de rB2 entraîne une diminution significative du nombre de colonies comparativement à la lignée contrôle.

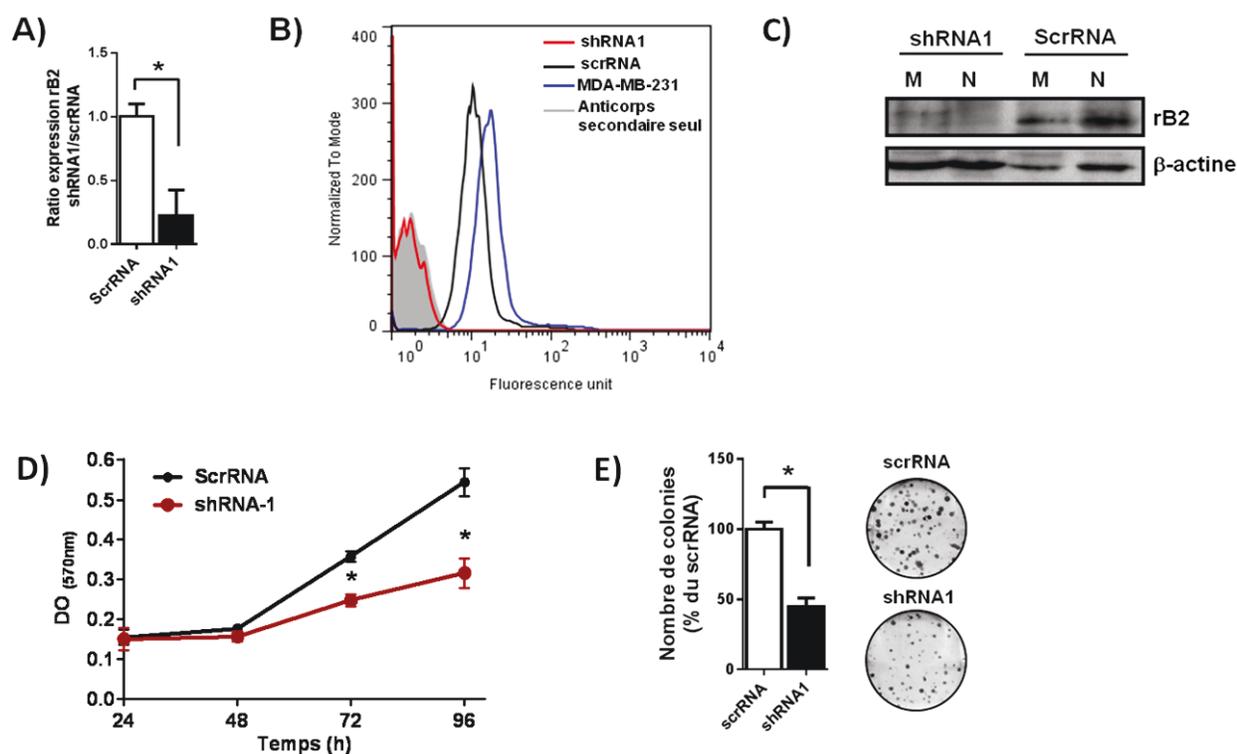


Figure 18: Effet du knockdown du gène de rB2 sur la prolifération et le potentiel clonogénique des cellules MDA-MB-231.

L'efficacité de l'inactivation du gène de rB2 (knockdown) chez une lignée de MDA-MB-231 (shRNA1) comparativement à une lignée contrôle (scrRNA) a été déterminée par RT-qPCR (A), cytométrie de flux (B) et immunobuvardage (C). L'immunobuvardage montre la comparaison de l'expression dans la fraction nucléaire (N) et membranaire (M) entre la lignée contrôle et la lignée knockdown. La prolifération (par MTT) (D) et le potentiel de clonogénicité (E) ont également été testés. Cytométrie de flux : l'anticorps primaire est le LS-A797 et l'anticorps secondaire est un IgG de chèvre anti-lapin couplées à l'Alexa Fluor 488. Les résultats des essais clonogéniques ont été analysés avec le logiciel Image Pro Plus. RT-qPCR et essai de clonogénicité: les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de  $n=3$  avec  $*p<0.05$  comparativement au contrôle selon un test T de Student non pairé. Essai de prolifération en MTT: les résultats représentent  $n=6-8$  puits par temps selon un test ANOVA couplé à un Dunnett où  $*p<0.05$ .

En plus de tester l'effet d'un « knockdown » de rB2 sur la prolifération et le potentiel clonogénique des cellules MDA-MB-231, nous avons aussi fait des tests de prolifération en MTT avec les antagonistes perméants de rB2 pour vérifier quel était l'impact d'un knockdown du gène rB2 sur l'effet de ces antagonistes. La Figure 19, A, montre que la prolifération du clone shRNA1 est moins affectée par les antagonistes perméants que celle du clone scrRNA, et ce, autant pour le FR173657 que le NG68, après 72h d'incubation. La différence de prolifération cellulaire est moins flagrante avec le NG68 mais demeure toutefois significative entre les scrRNA et les shRNA1.

Toujours dans le cadre d'essais MTT, nous avons aussi réalisé des tests de toxicité du FR173657 et du NG68 sur nos deux lignées distinctes. Les résultats obtenus concordent avec ceux de prolifération, c'est-à-dire que les effets cytotoxiques des antagonistes perméants sont diminués plus fortement chez les cellules knockdown rB2 par comparaison aux cellules contrôles (Figure 19, B).

L'ensemble de ces résultats supportent l'idée que les antagonistes perméants nécessitent la présence de rB2 pour exercer leurs effets anticancéreux de manière optimale.

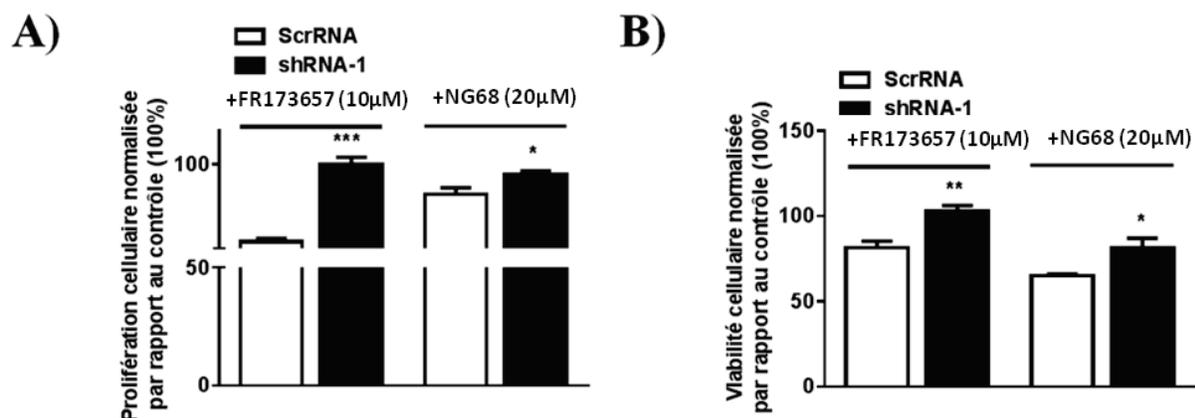


Figure 19: Effets des antagonistes rB2 perméants sur la prolifération et la viabilité cellulaire chez une lignée knockdown rB2 de MDA-MB-231.

Les essais MTT de prolifération (A) et de viabilité (B) montrent l'effet d'un knockdown sur l'activité cytocyde et cytotoxique des antagonistes rB2 chez les MDA-MB-231 après un traitement de 72h, 37°C. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de n=6-8 puits avec \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  et \*\*\*  $p < 0.001$  comparativement au contrôle (cellules MDA-MB-231 non traitées) selon un test T de Student non pairé.

## 2. Partie 2: rB1

**OBJECTIF 1** : Déterminer l'expression et la distribution subcellulaire des récepteurs des kinines chez des lignées tumorales de cancer du sein (dont une lignée de cancer du sein triple-négative) ainsi que dans des biopsies mammaires malignes humaines.

Tout comme pour l'étude des rB2, nous avons commencé par établir le niveau d'expression de rB1 dans diverses lignées de cancer du sein humain par RT-qPCR. Toutes les lignées testées montrent une expression de rB1 (Figure 20 A). De plus, la lignée triple-négative MDA-MB-231 est celle qui présente la plus forte expression de rB1, soit trois fois supérieure à celle de la lignée contrôle MCF-10A.

Nous avons ensuite déterminé la répartition subcellulaire de ces récepteurs chez les MDA-MB-231 par immunobuvardage, cytométrie de flux et microscopie électronique. L'analyse par immunobuvardage réalisée avec 2 anticorps polyclonaux dirigés contre le rB1 humain, montre la présence de rB1 principalement dans la fraction nucléaire (N) (Figure 20, B).

Ces résultats sont confirmés par l'analyse en cytométrie de flux (Figure 20, C). En effet, tout comme pour les rB2, lorsque des cellules non perméabilisées sont utilisées, on observe un très faible déplacement de la courbe de fluorescence (indiquant une faible présence de récepteurs à la surface) tandis que, lorsque ces mêmes cellules sont perméabilisées à la saponine, le déplacement observé est beaucoup plus important (indiquant une plus forte densité de rB1). Ce même déplacement de la courbe est observé avec des échantillons de noyaux isolés appuyant le fait que le déplacement observé chez les cellules perméabilisées est bien dû aux récepteurs nucléaires. Ici, encore, deux anticorps spécifiques différents ont été utilisés et ont donné des résultats similaires.

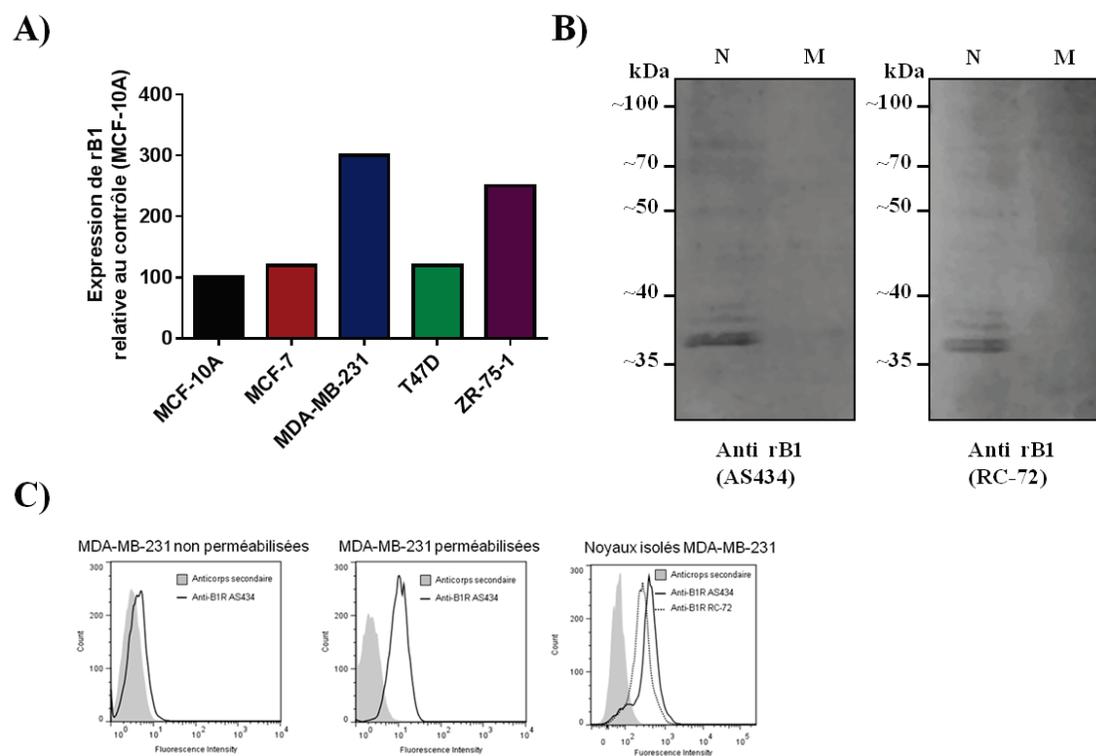
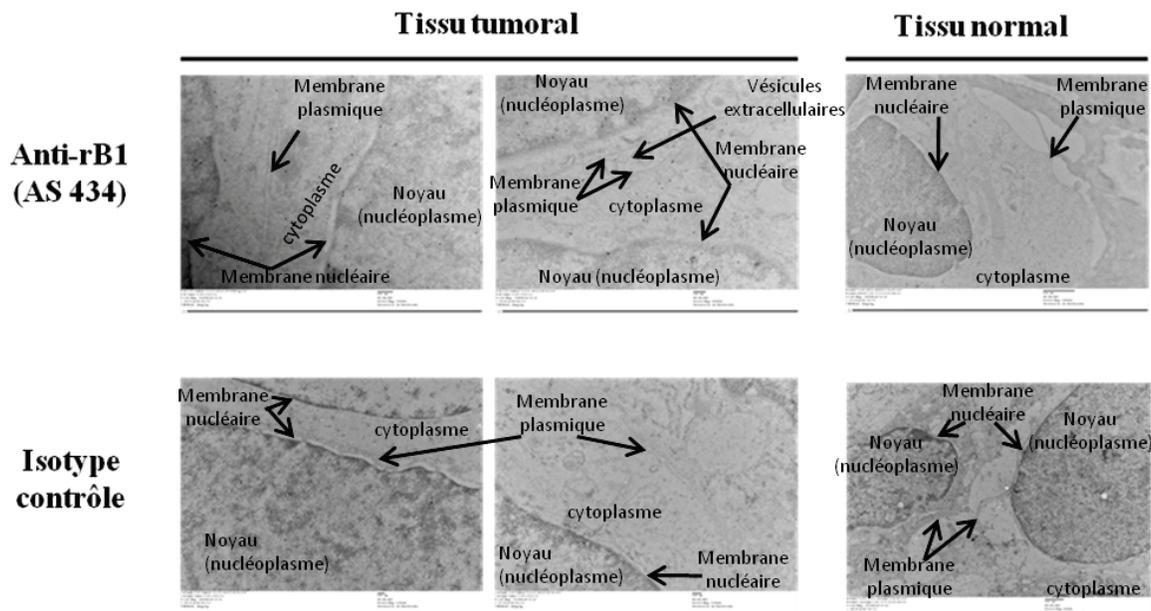


Figure 20: Expression de rB1 chez diverses lignées humaines de cancer du sein.

Le RT-qPCR quantitatif (A) montre les niveaux d'expressions d'ARNm de rB1 chez diverses lignées de cancer mammaire (n=1) alors que l'immunobuvardage (B) et la cytométrie de flux (C) montrent ceux des protéines dans des fractions membranaires (M) et nucléaires (N) de MDA-MB-231. Les MCF-10A ont été utilisées comme contrôle et les divers anticorps utilisés sont indiqués pour chacune des parties.

Ici encore, la microscopie électronique à transmission vient appuyer les résultats obtenus *in vitro* chez la lignée MDA-MB-231 en montrant la présence de rB1 dans un spécimen clinique de biopsie de cancer du sein de type triple-négatif non traité par chimiothérapie. En effet, la microscopie électronique montre que rB1 n'est pas seulement retrouvé à la membrane ou au noyau mais bien partout dans le tissu tumoral contrairement au tissu normal où il n'est pratiquement pas retrouvé (Figure 21 A). De plus, la quantification de rB1 réalisée sur ces images de microscopie électronique indique la présence d'une surexpression de rB1 près de dix fois plus grande chez les cellules tumorales comparativement aux cellules contrôles, et ce, autant dans les compartiments nucléaires que cytoplasmiques (Figure 21, B).

A)



B)

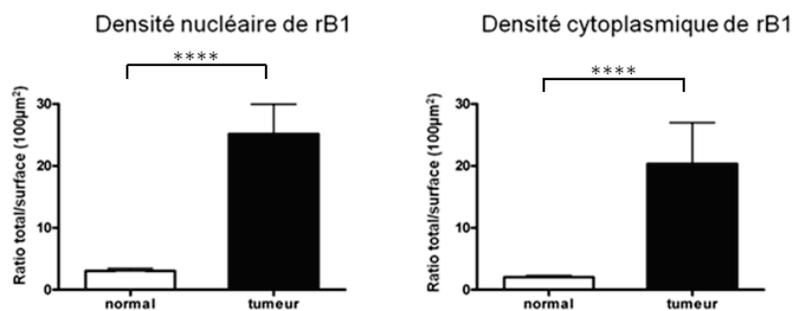


Figure 21: Localisation intracellulaire/nucléaire de rB1 chez des spécimens cliniques de cancer du sein triple-négatif.

La microscopie électronique à transmission (A) montre la répartition de rB1 dans un tissu normal (panneau du haut à droite) et de cancer du sein (panneaux du haut à gauche et centre) dans un spécimen clinique (biopsie) de cancer du sein triple-négatif comparativement au contrôle (isotype contrôle, panneaux du bas) et la quantification (B) de la densité de rB1 au noyau et dans le cytoplasme confirme une surexpression de rB1 chez des cellules tumorales comparativement à des cellules saines de sein au noyau et à la membrane. Dilution des anticorps: primaire 1:25 et secondaire 1:20. Les résultats ont été analysés de la même façon que ceux de rB2 avec \*\*\*\* $p < 0.0001$  comparativement au contrôle selon un test T de Student non pairé.

*OBJECTIF 2: Développer et caractériser de nouveaux antagonistes perméants pour l'étude des fonctions des rB1 intracellulaires/nucléaires.*

La Figure 22 montre les structures des antagonistes perméants et non perméants utilisés pour cet objectif et leurs caractéristiques pharmacologiques sont résumées dans le Tableau 6. Trois antagonistes peptidiques (R954, NG67 et NG2000) ont été utilisés dans le cadre de ce projet ainsi qu'un non-peptidique (SSR240612). Tout comme pour l'antagoniste rB2 Hoe 140, nous avons synthétisé et développé différentes formes perméables des antagonistes R954 et R715 par fusion aux vecteurs D-Tat et lauryl (NG67 et NG2000, respectivement).

D'après les résultats d'incorporation cellulaire (montrés dans le Tableau 6), NG67 et NG2000 sont perméants tel qu'indiqué par une incorporation cellulaire de ces deux peptides après seulement 15min d'incubation contrairement au R954. Le SSR240612 est également perméant et présente une très forte incorporation cellulaire après 15min lui aussi. De plus, comme l'indique le Tableau 6, les modifications apportées à nos peptides dans le but de les rendre perméants n'affectent peu ou pas leurs caractéristiques pharmacologiques ainsi que leur affinité pour leur récepteur. On peut également constater que l'antagoniste NG67 a des propriétés pharmacologiques (affinité, puissance) assez semblables à celles de la molécule mère, le R954 (Tableau 6).

Les valeurs positives de Log D mesurées pour les antagonistes NG2000 et SSR240612 indiquent que ces composés peuvent passer directement à travers des membranes cellulaires alors que la valeur négative de Log D pour l'antagoniste peptidique NG67 reflète potentiellement une voie d'entrée qui ne dépend pas d'un mécanisme de diffusion passive tout comme le NG68.

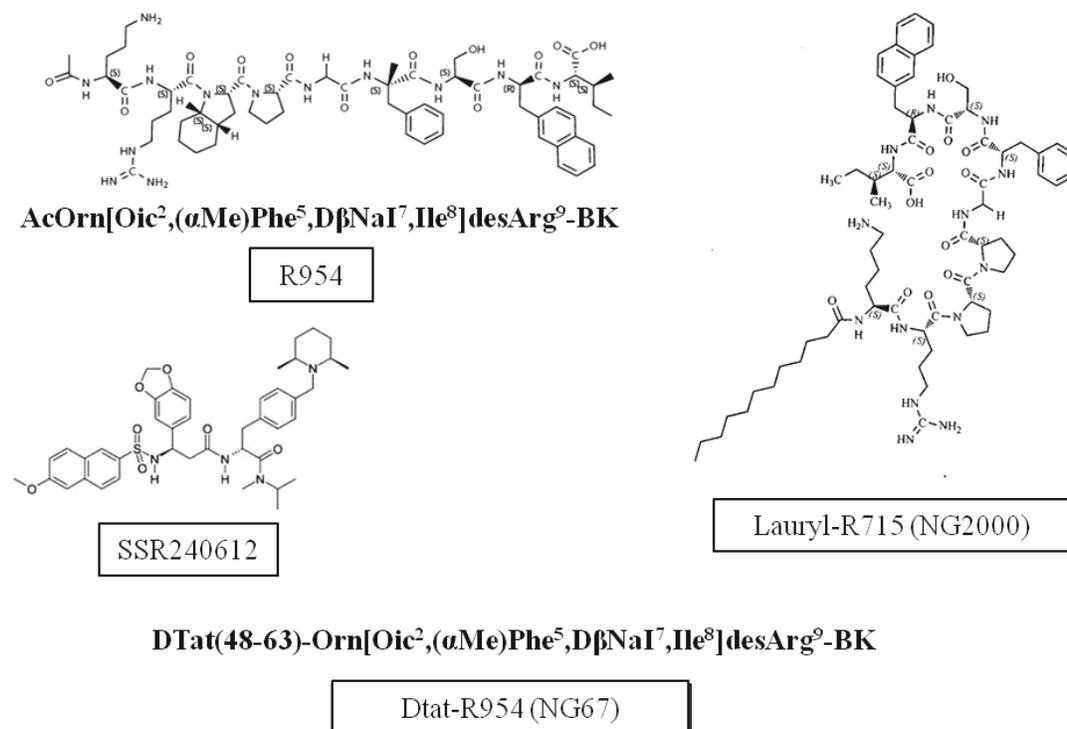


Figure 22: Structures chimiques des antagonistes rB1 utilisés dans le cadre de ce projet. Le R954, le NG67 et le NG2000 sont des antagonistes développés dans le laboratoire du Pr Gobeil alors que l'antagoniste non peptidique SSR240612 est une gracieuseté de la compagnie Sanofi-Aventis.

Tableau 6: Caractéristiques pharmacologiques et physicochimiques des antagonistes rB1 des kinines utilisés dans le cadre de ce projet.

Agents	HEK293T	VOH	LogD n-octanol/PBS (pH 7.4)	Incorporation cellulaire ( $\mu\text{mol}/10^6$ cellules)	
	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)		15 min	4 h
R954	13.5 $\pm$ 2	18 $\pm$ 1	-0.11 $\pm$ 0.05	0	0
SSR240612	2.2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	2.89 $\pm$ 0.33	966 $\pm$ 111	5165 $\pm$ 1800
NG2000	14 $\pm$ 10	346 $\pm$ 10	4.43 $\pm$ 0.02	21 $\pm$ 13	34 $\pm$ 21
NG67	11 $\pm$ 2	15 $\pm$ 12	-3.02 $\pm$ 0.15	44 $\pm$ 19	99 $\pm$ 25

**OBJECTIF 3:** Déterminer *in vitro* les effets des antagonistes rB1 perméants et non-perméants sur la prolifération et l'induction de l'apoptose des cellules MDA-MB-231.

Tout comme pour rB2, nous avons débuté l'étude des effets des antagonistes de rB1 sur les MDA-MB-231 par un essai de clonogénicité. Les résultats obtenus dans cet essai montrent que l'antagoniste non perméant R954 ne provoque pas d'inhibition du potentiel de clonogénicité (nombre de colonies) significatif comparativement au contrôle, contrairement aux antagonistes perméants qui montrent tous une inhibition (nombre de colonies) dépendante de la concentration d'antagoniste utilisée, et ce, à des concentrations aussi petites que 2,5 $\mu$ M (Figure 23, A).

Des tests de clonogénicité en milieu semi-solide (agar mou) ont également été réalisés et les résultats obtenus concordent avec les précédents, l'antagoniste non perméant ne provoquant aucune diminution du potentiel de clonogénicité contrairement à tous les antagonistes perméants testés (Figure 23, B).

Ici aussi nous avons fait un blocage des rB1 de surface en pré-incubant des MDA-MB-231 avec une concentration saturante (10 $\mu$ M) d'antagoniste non perméant (R954) avant de faire un test de clonogénicité dans le but d'étudier l'impact des rB1 nucléaires/intracellulaires. Les récepteurs nucléaires semblent en effet être impliqués dans la diminution du potentiel de clonogénicité des MDA-MB-231, puisque même avec un blocage des récepteurs de surface, on remarque toujours une diminution de la clonogénicité de ces cellules, et ce, pour tous les antagonistes perméants testés (Figure 23, C).

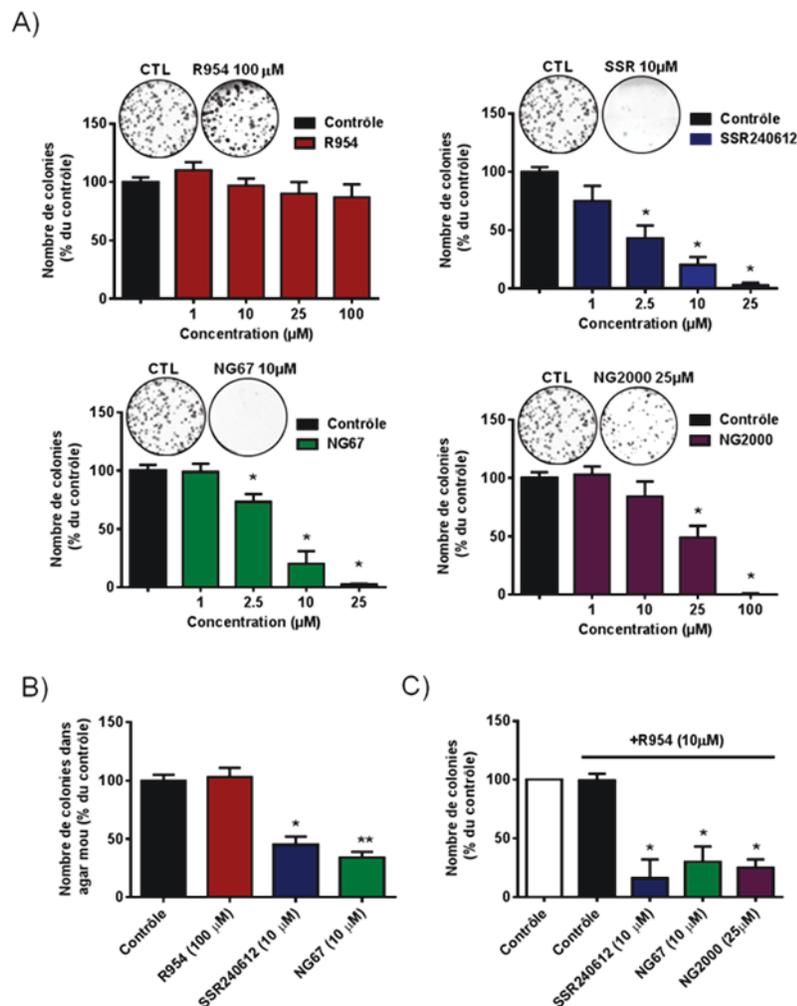


Figure 23: Effets des antagonistes rB1 sur le potentiel clonogénique des MDA-MB-231. Les tests de clonogénicité (durée totale de 14 jours) montrent les effets des antagonistes de rB1 sur le potentiel de clonogénicité des cellules MDA-MB-231 adhérentes (A, C). Les résultats des essais de clonogénicité en agar mou (durée totale de traitement d'environ 28 jours) sont également présentés (B). Essais réalisés sur cellules adhérentes avec un blocage préalable des rB1 de surface avec le R954 (10  $\mu\text{M}$ , 15 min avant le début du traitement) (C). Les contrôles représentent des cellules non traitées mais mise dans les mêmes conditions que celles traitées et ce pour la durée de l'expérience. Les résultats ont été analysés avec le logiciel Image Pro Plus. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 4-8 expériences avec \* $p < 0.05$  et \*\* $p < 0.01$  comparativement au contrôle selon un test ANOVA couplé à un test de Dunnett.

La prolifération et la viabilité cellulaire ont ensuite été étudiées, toujours sur les MDA-MB-231, par des essais de MTT. Dans le cas de la prolifération cellulaire, nous avons réalisé l'étude sur une période de 72h à diverses concentrations en les comparant avec un contrôle de cellules n'ayant pas été traitées (Figure 24, A). Les résultats obtenus suivent la même tangente que les précédents où tous les antagonistes perméants testés montrent une diminution dans la prolifération cellulaire, et ce, à partir de 24h d'incubation et à des concentrations aussi petites que 2,5 $\mu$ M alors que l'antagoniste perméant ne montre aucun effet (et ce jusqu'à 100 $\mu$ M). Toutefois, le NG2000 semble un peu moins efficace dans la diminution de la prolifération puisque des concentrations plus fortes ont dû être utilisées pour obtenir une diminution significative.

Les essais de viabilité pour leur part, montrent que, tout comme les essais de prolifération, les antagonistes perméants entraînent une diminution de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration utilisée, contrairement à l'antagoniste non perméant (Figure 24, B).

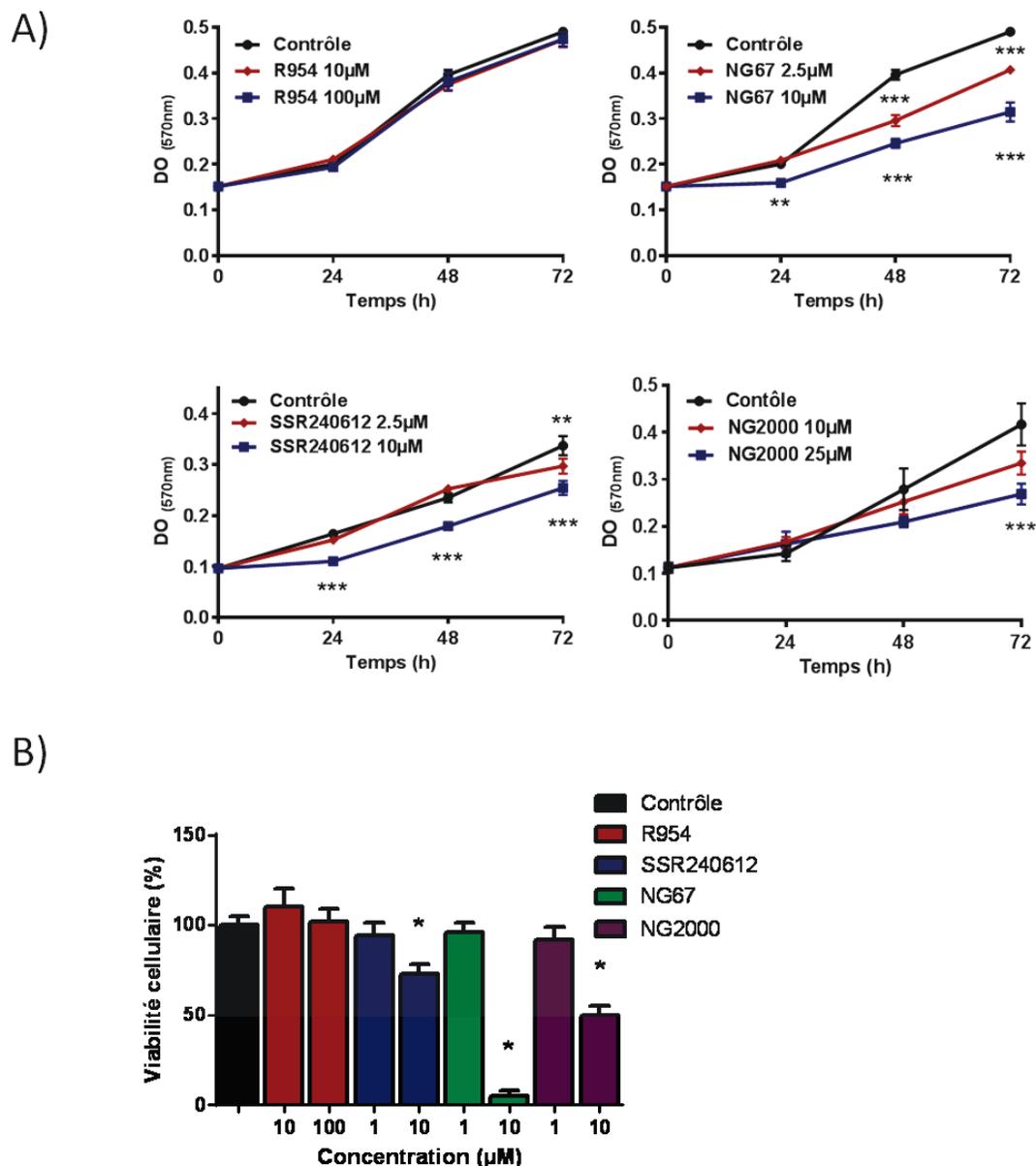
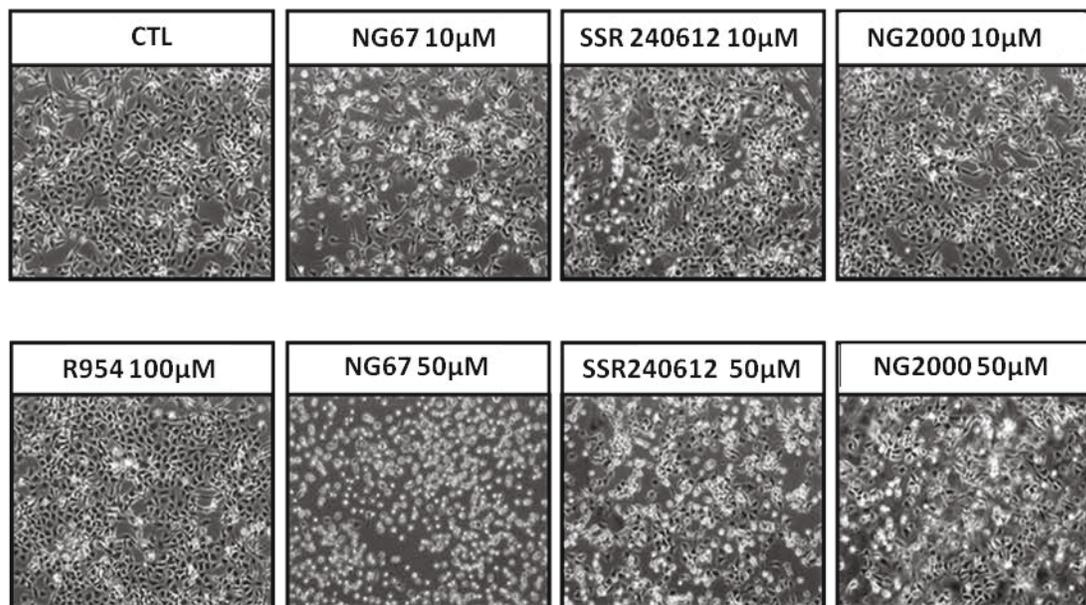


Figure 24: Effets des antagonistes rB1 perméants sur la prolifération et la viabilité cellulaire des cellules MDA-MB-231.

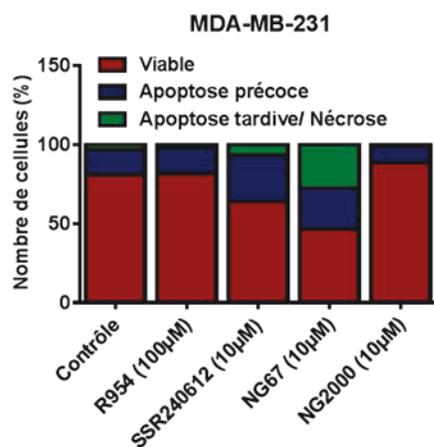
Les effets des antagonistes rB1 sur la prolifération (A) et la viabilité cellulaire (B) ont été déterminés par des tests colorimétriques MTT. Pour les essais de prolifération, les cellules (2000 cellules/puits, 96 puits) ont été incubées dans le milieu DMEM / 10% sérum en présence ou non des différents agents aux temps et aux concentrations indiqués. Pour les essais de viabilité, les cellules (à quasi-confluence) ont été incubées avec ou sans les différents agents pendant 72 h dans le milieu DMEM sans sérum. Les résultats représentent n=6-8 puits par condition avec un test ANOVA couplé à un test de Dunnett ou \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 et \*\*\* p < 0.001.

Suite aux résultats obtenus avec les essais de prolifération et de viabilité cellulaire montrant clairement une diminution dans les deux cas, nous nous sommes intéressés à l'implication de l'apoptose. D'un point de vue qualitatif seulement, une observation au microscope nous a rapidement permis de constater que les antagonistes perméants entraînent la mort des cellules tel que présenté à la Figure 25, A, par l'arrondissement et le changement de couleur (blanche) des cellules comparativement au contrôle et à l'antagoniste non perméant qui ne présentent qu'un minimum de mortalité cellulaire en comparaison. De façon quantitative, nous avons mesuré l'apoptose par cytométrie de flux (avec marquage à l'Annexine V et iodure de propidium) qui indique que les antagonistes perméants entraînent une augmentation de l'apoptose précoce et tardive/nécrose (Figure 25, B), phénomène relié spécifiquement aux rB1 puisque le même essai réalisé dans des cellules COS-1 qui ne possèdent pas de rB1 ne montre aucune augmentation de l'apoptose, qu'elle soit précoce ou tardive (Figure 25, C). De plus, ce phénomène est relié aux rB1 intracellulaires/nucléaires puisque l'antagoniste non perméant n'a pas d'effet sur les MDA-MB-231.

A)



B)



C)

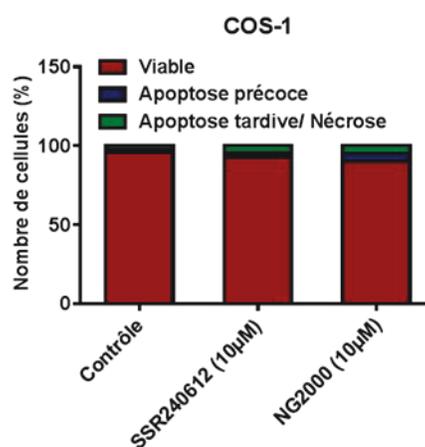


Figure 25: Effets des antagonistes rB1 perméants sur l'induction de l'apoptose des cellules MDA-MB-231 et COS-1.

La microscopie à contraste de phase (A) montre la morphologie cellulaire des MDA-MB-231 traitées avec les antagonistes rB1 et l'incidence d'apoptose a été évaluée par cytométrie de flux chez des MDA-MB-231 (B) et des COS-1 (C). Les cellules quasiconfluentes placées dans du milieu DMEM sans sérum ont été traitées avec les antagonistes rB1 pendant 24 h à 37°C puis marquées à l'Annexine-V et l'iodure de propidium. L'intensité de fluorescence a été analysée avec le logiciel CellQuest. Les contrôles représentent des cellules non traitées mais mise dans les mêmes conditions que celles traitées et ce pour la durée de l'expérience. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences.

Nous avons également utilisé les essais MTT pour déterminer l'activité cytotoxique des divers agents (Tableau 7) que nous avons par la suite comparés aux mêmes agents chimiothérapeutiques commerciaux utilisés pour le traitement du cancer du sein. Nous avons ainsi découvert que nos antagonistes perméants possèdent des  $IC_{50}$  comparables et parfois même inférieurs aux agents chimiothérapeutiques commerciaux. En effet, des agents chimiothérapeutiques commerciaux, seul la doxorubicine présente un  $IC_{50}$  inférieur à nos antagonistes et le paclitaxel qui possède un  $IC_{50}$  comparable.

Nous avons aussi testé le potentiel de synergie de nos antagonistes rB1 perméants avec certains agents cytotoxiques commerciaux. Les résultats de MTT couplés à une analyse par logiciel Compusyn nous a permis de démontrer qu'il y a bien une synergie entre la doxorubicine et le NG67 ainsi que le SSR240612. Par contre, il ne semble pas y avoir de synergie entre NG67 et le paclitaxel mais une synergie entre ce dernier et le SSR240612 (Tableau 8).

Tableau 7: Comparaison des activités cytotoxiques des antagonistes rB2 avec des agents chimiothérapeutiques utilisés en clinique dans le traitement du cancer du sein.

Agents	IC <sub>50</sub>
R954	> 100 $\mu$ M
SSR240612	10 $\pm$ 1 $\mu$ M
NG67	10 $\pm$ 1 $\mu$ M
NG2000	15 $\pm$ 1 $\mu$ M
BCNU (Carmustine)	62 $\pm$ 1 $\mu$ M
Doxorubicine (Adriamycin)	2 $\pm$ 1 $\mu$ M
Carboplatine	> 100 $\mu$ M
Temozolomide (Temodar)	> 100 $\mu$ M
Paclitaxel (Taxol)	10 $\pm$ 1 $\mu$ M

\*Se référer au Tableau 4 pour une description de la méthodologie.

Tableau 8: Synergie entre les antagonistes perméants rB1 et des agents cytotoxiques commerciaux.

Antagoniste	Agent cytotoxique	CI
NG67 (10 $\mu$ M)	Doxorubicine (2 $\mu$ M)	0,86
NG67 (10 $\mu$ M)	Paclitaxel (10 $\mu$ M)	1,28
SSR240612 (10 $\mu$ M)	Doxorubicine (2 $\mu$ M)	0,64
SSR240612(10 $\mu$ M)	Paclitaxel (10 $\mu$ M)	0,90

\*Se référer au Tableau 5 pour une description de la méthodologie et la signification des résultats.

## CHAPITRE 6

### *Discussion et conclusion*

Le sixième et dernier chapitre de cette thèse sera à l'image du chapitre précédent portant sur les résultats du projet et sera subdivisé par objectifs. Toutefois, les résultats obtenus pour rB1 et rB2 étant très similaires, les deux types de récepteurs seront discutés en même temps sous le terme général de «récepteurs des kinines» et les différences entre les deux types seront soulignées ponctuellement dans le texte. La première partie servira à reprendre l'essentiel des résultats obtenus en plus d'apporter certains éléments non discutés dans la section résultats (par exemple les résultats non publiés, les limitations, etc.). Dans la seconde partie, quelques pistes de réponses et perspectives relatives à ce projet de recherche seront décrites, en plus d'une conclusion générale.

**OBJECTIF 1 :** *Déterminer l'expression et la distribution subcellulaire des récepteurs des kinines chez des lignées tumorales de cancer du sein (dont une lignée de cancer du sein triple-négative) ainsi que dans des biopsies mammaires malignes humaines.*

Dans le cadre de cet objectif, nous avons fait la démonstration de la présence des récepteurs des kinines ainsi que de leur localisation subcellulaire en utilisant diverses méthodologies complémentaires telles le RT-qPCR, l'immunobuvardage, la cytométrie de flux et la microscopie confocale à balayage laser. Parmi les lignées cellulaires de cancer du sein étudiées, la lignée MDA-MB-231 s'est avérée être une des lignées qui surexprime de manière plus élevée les récepteurs des kinines ce qui en faisait un excellent modèle pour notre étude.

Le RT-qPCR permet de démontrer la présence de l'ARNm, mais ne donne aucune information quant à la traduction en protéines fonctionnelles. C'est pourquoi nous avons également fait de la cytométrie de flux et de l'immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques. Ces techniques nous ont également permis de déterminer la présence de rB1 et rB2 des kinines dans la zone nucléaire/intracellulaire entre autre par l'utilisation de fractions de noyaux purifiés. Toutefois,

il est à noter que ces fractions nucléaires comportent également des éléments du réticulum endoplasmique. Ceci était attendu puisque la membrane nucléaire externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique.

La présence des récepteurs des kinines et autres composantes du SKK chez des lignées cellulaires humaines de cancer du sein ainsi que des échantillons cliniques de tumeurs du sein, a été documentée récemment (Greco *et al.* 2004; Greco *et al.* 2005; Morissette *et al.* 2007; Wright *et al.* 2008; Ehrenfeld *et al.* 2009; Molina *et al.* 2009; Van Winden *et al.* 2009; Ehrenfeld *et al.* 2011; Ehrenfeld *et al.* 2014). Notre groupe de recherche a contribué dans ce secteur en démontrant la présence des rB2 et rB1 chez différentes lignées de cancer du sein dont la lignée hormono-indépendante MDA-MB-231, ceci à l'aide de différentes approches expérimentales (RT-PCR, immunobuvardage, microscopie confocale) (Fortier 2007). Nous avons également décrit la localisation membranaire et nucléaire des rB2 dans la lignée MDA-MB-231 (Fortier 2007). Dans le cadre de ce projet, nous avons confirmé ces résultats démontrant ainsi la répétabilité ou reproductibilité intra-laboratoire, mais nous sommes allés encore plus loin en démontrant que ces résultats *in vitro* peuvent se transposer en situation clinique par l'analyse de biopsies de cancer du sein triple-négatif de patientes à l'aide de la microscopie électronique à transmission (Figures 11 et 22). Cette approche nous a permis de localiser à l'échelle ultrastructurale la présence des rB2 et rB1 en grande partie dans le compartiment nucléaire, mais également dans le cytoplasme (possiblement associés à des vésicules/endosomes), au niveau du réticulum endoplasmique ainsi qu'en moins grande densité à la membrane plasmique. À partir des micrographies obtenues par microscopie électronique, nous avons pu mettre en évidence l'expression surnuméraire et la localisation nucléaire prédominante des rB1 et rB2 des kinines dans les cellules de TNBC par comparaison aux cellules épithéliales mammaires saines. Cette augmentation de la localisation nucléaire serait trois et dix fois plus élevée pour les rB2 et rB1, respectivement (Figures 11 et 22). En raison du trop faible échantillonnage des biopsies ( $n=3$ ), nous n'avons pu procéder à une étude de corrélation entre les spécimens de TNBC et la localisation nucléaire atypique des rB1 et rB2. D'autres études seront à faire pour valider cette association. Les mécanismes par lesquels les récepteurs des kinines se retrouvent majoritairement dans le compartiment (péri)nucléaire demeurent à ce jour inconnu. La présence des deux types de récepteurs des kinines au niveau de la zone périnucléaire laisse croire à un adressage nucléaire de ces derniers soit par transport

vésiculaire ou encore par diffusion latérale à partir du RE (Gobeil *et al.* 2006a). La théorie d'une SLN est également une possibilité puisqu'une séquence de type SLN a été identifiée chez rB2 (Lee *et al.* 2004). Cependant pour le rB1 qui ne comporte pas cet élément de transport au noyau, des mécanismes différents pourraient être impliqués notamment la régulation de l'import nucléaire des rB1 par l'association avec d'autres protéines cytosoliques contenant une SLN (Gobeil *et al.* 2006a). La présence de modifications post-transcriptionnelles (épissage alternatif) et post-traductionnelles (glycosylation) peut aussi être considérée comme un mécanisme possible (voir revues par Gobeil *et al.* 2006a; Vaniotis *et al.* 2011; Campden *et al.* 2015).

Autre observation intéressante, la microscopie électronique nous a permis de visualiser la présence des deux types des récepteurs des kinines au niveau des vésicules extracellulaires qui englobent les microvésicules, les microparticules et les exosomes (Figures 11 et 22). Ces structures vésiculaires à bicouche lipidique sont sécrétées par les cellules tumorales dans leur microenvironnement local et niche pré-métastatique et peuvent transférer de l'ARNm et des protéines à diverses cellules environnantes de manière autocrine et paracrine. Ce transfert entraîne la croissance tumorale, l'immunosuppression et la formation de métastases (Green *et al.* 2015). Les vésicules extracellulaires présentent un potentiel particulièrement intéressant en tant que biomarqueurs du cancer du sein et cibles thérapeutiques potentielles (Sadovska *et al.* 2015). La présence de récepteurs des kinines dans ces vésicules extracellulaires laisse croire que les antagonistes des kinines pourraient agir comme modulateurs négatifs de l'activité des rB1 et rB2 au niveau des microparticules sécrétées par les cellules cancéreuses mammaires.

En plus de la présence des récepteurs des kinines dans la zone périnucléaire, nous avons également démontré la présence d'autres composantes du SKK dans le cytoplasme des cellules MDA-MB-231. En effet, nous avons visualisé par microscopie confocale la présence de kininogènes immunoréactifs (Figure 10, B). Cependant, l'anticorps utilisé ne nous permet pas de différencier entre le KHPM et le KFPM. Par ailleurs, notre groupe a soulevé l'hypothèse de la présence de codons d'initiation alternatifs pouvant expliquer la rétention intracellulaire et localisation nucléaire de KHPM dans les hépatocytes de rat (Savard *et al.* 2008). Le même principe pourrait donc s'appliquer pour expliquer la présence de kininogènes dans les cellules MDA-MB-231.

Nous avons de plus détecté la présence de la Kt ainsi que la BK immunoréactives dans le cytoplasme (Figure 10, B et C, respectivement). La présence de toutes les composantes nécessaires à la biosynthèse des kinines à l'intérieur des cellules MDA-MB 231 vient appuyer la théorie du rôle intracrine des récepteurs des kinines dans le cancer du sein triple-négatif. Bien qu'il s'agisse là d'une preuve indirecte, il est possible de croire que les récepteurs des kinines localisés dans le compartiment nucléaire peuvent être activés par leur ligand endogène respectif et que leurs liaisons puissent entraîner des effets sur la prolifération des cellules TNBC. Ce même postulat a été proposé notamment pour les récepteurs CysLT1 et CXCR4 dans les cancers du sein et colorectal (Shibuta *et al.* 2002; Nielsen *et al.* 2005; Valdehita *et al.* 2010; Don-Salu-Hewage *et al.* 2013).

Au commencement de cette étude, la présence de rB1 avait déjà été démontrée pour certaines lignées de cancer du sein, dont les MCF-7 et les ZR-75-1 (Molina *et al.* 2009) mais pas pour aucune lignée de TNBC comme les MDA-MB-231. D'ailleurs, le groupe de Morissette n'a détecté aucun site de liaison spécifique avec le radioligand [<sup>3</sup>H]-LDBK chez les cellules MDA-MB-231 (Morissette *et al.* 2007). Cependant, le groupe d'Ehrenfeld a récemment publié des résultats appuyant les nôtres en démontrant la présence de rB1 dans cette lignée de TNBC (Ehrenfeld *et al.* 2011; Ehrenfeld *et al.* 2014). Il serait fort intéressant et pertinent, dans le cadre d'une validation rigoureuse de nos résultats de recherche, d'étendre l'étude de l'expression de rB1 à d'autres lignées de TNBC telles les lignées SUM, BT et HCC (Chavez *et al.* 2010).

Le rB1 étant une entité protéique inductible, la question demeure: comment l'induction des rB1 se fait-elle chez les cellules cancéreuses? Les cytokines inflammatoires sont des inducteurs bien connus de rB1 dont l'un des principaux est l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Marceau *et al.* 1998). Notre groupe avait déjà démontré l'expression de l'IL-1 $\beta$  chez une lignée de cellules tumorales du cerveau (F98) (Côté *et al.* 2012). De plus, le groupe de Han a récemment démontré la présence d'IL-1 $\beta$  chez les MDA-MB-231 (Han *et al.* 2014) ce qui nous porte donc à croire qu'IL-1 $\beta$  représente un bon point de départ dans la réponse à cette question. D'ailleurs, les cytokines inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , TFG- $\beta$  et IL-1 peuvent également moduler l'expression de rB2 à la membrane plasmique et sont surexprimées chez plusieurs types de cancer dont le cancer du sein (Chang *et al.* 2016). La signalisation autocrine/paracrine des cytokines produites par les cellules

tumorales pourrait donc expliquer la surexpression des récepteurs des kinines dans les différentes lignées cancéreuses incluant les cellules TNBC.

L'importance des récepteurs nucléaires et leur ciblage spécifique est de plus en plus évidente dans le traitement du cancer. En effet, le groupe de Don-Salu-Hewage a démontré que CXCR4 avait non seulement une localisation nucléaire mais était aussi fonctionnel dans des cellules métastatiques de cancer de la prostate (Don-Salu-Hewage *et al.* 2013). D'où l'importance de développer des tactiques pour faire pénétrer les ligands à l'intérieur des cellules et ainsi cibler les récepteurs nucléaires comme cela a d'ailleurs été souligné dans une revue récente par le groupe de Joyal en 2015 (Joyal *et al.* 2015). Ce sujet était l'objet de l'objectif 2 et sera donc discuté dans cette section.

**OBJECTIF 2** : Développer et caractériser de nouveaux antagonistes perméants pour l'étude des fonctions des récepteurs des kinines intracellulaires/nucléaires.

Les kinines ayant de base un rôle dans la prolifération cellulaire, la surexpression de ces récepteurs et leur présence au niveau nucléaire chez des lignées de cancer du sein porte à croire qu'elles pourraient avoir un rôle dans le développement et/ou la prolifération des tumeurs du sein et que leur ciblage spécifique pourrait être un outil efficace dans le développement d'un traitement anti-cancer. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux antagonistes des kinines et aux effets qu'ils pourraient avoir sur la prolifération et la survie cellulaire tumorale. En effet, est-ce que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs des kinines pourrait diminuer la prolifération et/ou la viabilité cellulaire? Est-ce que cibler les récepteurs intracellulaires/nucléaires aurait un impact différent de cibler ceux localisés à la surface des cellules?

Une tactique récemment développée dans le ciblage des récepteurs nucléaires consiste à protéger le ligand par un groupe hydrophobique tel une cage pour permettre au ligand de passer la membrane (Vaniotis *et al.* 2013; Tadevosyan *et al.* 2015). Une fois le ligand à l'intérieur, ce dernier est activé par une exposition des cellules aux UVs pour détruire la cage hydrophobique tout en laissant le ligand intact. Or, les UVs étant peu pénétrants, cette approche est valide en mode *in vitro* sur cellules en culture mais serait très difficilement applicable dans un contexte naturel *in vivo* où son application se limiterait à des tumeurs de surface seulement.

Par ailleurs, notre laboratoire a adopté des stratégies différentes pour la conception et le développement d'antagonistes et d'agonistes de rB1 et rB2 perméants uniques et originaux (Neugebauer *et al.* 2005; Fortier 2007; Neugebauer *et al.* 2008; Dubuc *et al.* 2012a; Dubuc *et al.* 2012b).

Les résultats d'analyse en LC-MS/MS ont montré que les antagonistes perméants peptidiques développés dans notre laboratoire ainsi que ceux non-peptidiques provenant de l'industrie pharmaceutique étaient non seulement capables de pénétrer à l'intérieur des cellules, mais que cette pénétration avait lieu rapidement (après 15 min d'incubation) et à de faibles concentrations (2,5  $\mu$ M) (Tableaux 3 et 6). Ces résultats concordent également avec ceux obtenus précédemment

par notre groupe par microscopie confocale avec l'utilisation d'antagonistes couplés au fluorochrome FITC (Fortier 2007; Neugebauer *et al.* 2008)

De nombreux antagonistes des kinines ont été développés au fil du temps par divers groupes de recherche et ont démontré des propriétés anti-proliférative, anti-inflammatoire, anti-angiogénique et anti-migratoire dans un bon nombre de modèles cancéreux (voir revues par Leeb-Lundberg *et al.* 2005 ; Figueroa *et al.* 2012 ; da Costa *et al.* 2014). Entre autres, certains antagonistes rB1/rB2 peptidiques et non-peptidiques tels que B-9870 (CU201), BKM-570 et B9958 ont montré des activités anticancéreuses *in vivo* chez les souris Nu/nu athymiques implantées avec des cellules cancéreuses prostatiques (PC-3) et pulmonaires (SCLC) (Stewart *et al.* 2002a; Stewart *et al.* 2002b). Dans le cadre de cette étude, nous avons non seulement démontré la présence de récepteurs nucléaires des kinines dans un modèle de cancer du sein TNBC *in vitro* et sur des biopsies humaines mais nous avons également démontré qu'il était possible de diminuer la prolifération et d'induire sélectivement l'apoptose des cellules tumorales mammaires par l'utilisation d'antagonistes perméants.

**OBJECTIF 3 :** *Déterminer les effets des antagonistes perméants et non perméants sur la prolifération et l'induction de l'apoptose des cellules MDA-MB-231.*

Dans le cadre de cet objectif, nous avons étudié les effets des antagonistes des kinines sur les MDA-MB-231 par des tests de clonogénicité, de prolifération et de survie cellulaire en MTT ainsi que les voies de signalisation impliquées par immunobuvardage.

Le potentiel à former des clones est une caractéristique spécifique aux cellules tumorales et essentielle à leur propagation et c'est pourquoi nous avons fait des tests de clonogénicité. Les tests de clonogénicité ont montré que les antagonistes perméants des kinines entraînaient une diminution du potentiel de clonogénicité chez les MDA-MB-231 contrairement aux antagonistes non perméants (Figures 13 et 23). En effet, les cellules traitées avec des antagonistes perméants présentaient un nombre de colonies plus petit que le contrôle. De plus, cette diminution était dépendante de la concentration d'antagoniste utilisée et un blocage préalable des récepteurs de surface n'a pas changé les résultats obtenus suggérant bien l'implication des récepteurs intracellulaires/nucléaires dans les effets des antagonistes perméants. De plus, un double traitement des cellules avec à la fois un antagoniste et un agoniste rB2 perméant a annulé l'effet observé pour chacun individuellement, une autre preuve que les récepteurs intracellulaires/nucléaires des kinines jouent un rôle dans la prolifération des cellules MDA-MB-231 (Figure 13). Des résultats semblables ont aussi été obtenus dans les tests de clonogénicité en milieu semi-solide (Agar) (Figures 13 et 23).

Pour étudier la prolifération cellulaire tumorale des MDA-MB-231, nous avons utilisé le test de MTT. Ce test permet de déterminer l'activité métabolique des cellules via la fonction mitochondriale, qui est testée à l'aide d'un sel de tétrazolium. Dans un test de MTT, l'anneau de tétrazolium du sel est réduit en formazan par la succinate déhydrogénase des mitochondries ce qui donne une couleur plus ou moins violette à la solution reflétant le niveau d'activité mitochondriale. Par contre, si les cellules ne sont pas actives métaboliquement, la solution finale sera de couleur jaune. Cette technique colorimétrique a montré que les antagonistes perméants diminuaient la prolifération cellulaire des MDA-MB-231 contrairement aux antagonistes non perméants (Figures 14 et 24). Ici encore, les résultats semblent indiquer un rôle majeur des récepteurs

intracellulaires/nucléaires des kinines dans les effets des antagonistes perméants.

Il est à noter qu'aucun agonistes des kinines, perméants ou non, n'a été en mesure de réguler la prolifération lorsque testés en essais MTT. Toutefois, ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le test de prolifération et de viabilité en MTT repose sur une mesure indirecte de l'activité d'enzymes mitochondriales. Le test de clonogénicité, au contraire, teste le potentiel des cellules à former des clones et donc implique plusieurs aspects de la prolifération cellulaire.

Les antagonistes perméants ont démontré un impact significatif sur la diminution de la prolifération et la survie cellulaire lors des tests de clonogénicité et de MTT (Figures 13, 14, 23 et 24). Parallèlement, la microscopie optique nous a permis de visualiser des signes clairs de mort cellulaire entraînés par les antagonistes rB1 perméants sous la forme de cellules arrondies et/ou flottantes (Figure 25). Nous nous sommes donc questionnés sur le type de mort cellulaire qu'entraînaient les antagonistes perméants des récepteurs des kinines. À l'aide de tests d'apoptose en cytométrie de flux, nous avons pu constater que les antagonistes perméants entraînaient une augmentation de l'apoptose précoce et tardive/nécrose comparativement aux non perméants qui eux ne démontraient pas d'augmentation de l'apoptose (Figure 25). De plus, cet effet est dépendant des récepteurs des kinines puisque nous avons fait le même test avec la lignée COS-1 (lignée de fibroblastes du rein de singe) n'exprimant pas les récepteurs des kinines et nous n'avons vu aucun effet d'augmentation sur l'apoptose avec ces mêmes antagonistes. Ces résultats suggèrent que les effets pro-apoptotiques des antagonistes perméants sont médiés spécifiquement par les récepteurs intracellulaires/nucléaires des kinines.

En plus de l'apoptose, nous avons également testé la capacité de nos antagonistes rB2 à induire la sénescence (Figure 15). Nous avons donc réalisé un test de détection de la  $\beta$ -galactosidase dont la production est une caractéristique spécifique aux cellules sénescents. Nous avons ainsi découvert que les antagonistes perméants des kinines ne semblent pas engendrer la sénescence chez les cellules MDA-MB-231.

Les essais d'apoptose réalisés en cytométrie de flux avec l'annexine V et l'iodure de propidium ne nous permettent toutefois pas de distinguer entre l'apoptose tardive et la nécrose. Un

des moyens disponibles pour distinguer entre l'apoptose et la nécrose demeure l'activité de caspases puisque ces dernières sont impliquées dans l'apoptose seulement. C'est pourquoi nous avons réalisé des essais avec un anticorps spécifique à la caspase 3 en cytométrie de flux qui a démontré une activation de cette dernière lorsque des MDA-MB-231 étaient traitées avec l'antagoniste rB1 perméant SSR240612 (ANNEXE 1). Ces résultats ont été confirmés par MTT avec une pré-incubation des cellules avec l'inhibiteur non-sélectif des caspases 1 et 3, le Z-vad-Fmk (ANNEXE 1). Ces résultats montrent bien un effet pro-apoptotique des antagonistes perméants des kinines ainsi qu'une implication de la caspase 3 dans le mécanisme d'action de ces derniers, du moins pour ceux ciblant le rB1. Clairement, une étude plus approfondie est nécessaire pour déterminer le ou les mécanisme(s) exact(s) ainsi que toutes les caspases réellement impliquées autant pour rB2 que rB1.

Puisque nos antagonistes perméants démontraient des effets sur l'apoptose et la prolifération cellulaire, nous nous sommes interrogés sur les voies de signalisation potentiellement activées par ces derniers. Pour notre étude pilote, nous avons misé sur les voies de signalisation classiques de l'apoptose et la prolifération cellulaire soient Akt, JNK ainsi que MAPK p42/p44 et p38 (Figures 16 et 17).

Akt est une protéine kinase impliquée dans plusieurs processus cellulaires normaux et oncogéniques. Elle participe notamment à la prolifération cellulaire, le métabolisme du glucose, la stabilité du génome, la néo-vascularisation et supprime la mort cellulaire programmée ou apoptose (Altomare et Testa 2005; Bellacosa *et al.* 2005). Akt régule plusieurs fonctions centrales au cancer et est donc impliquée dans plusieurs types de cancer. En effet, l'activation d'Akt entraîne la chimiorésistance alors que son inhibition entraîne l'apoptose (Altomare et Testa 2005). Une hyperactivation de la voie Akt a d'ailleurs été notée chez de nombreux types de cancers humains dont la plupart des cancers du sein (Ciruelos Gil 2012; Paplomata et O'Regan 2014). Les résultats d'analyse en immunobuvardage pour évaluer l'implication d'Akt dans les effets des antagonistes perméants des kinines se sont avérés négatifs en ce qui concerne l'augmentation de l'expression de protéine (Figure 16) et il serait également important de tester la phosphorylation d'Akt dans le futur. Nous avons aussi testé une autre protéine anti-apoptotique impliquée dans la voie d'Akt soit XIAP. XIAP inhibe l'apoptose en se liant aux caspases 3,7 et 9 (Duckett *et al.* 1996; Liston *et al.* 1996; Duckett *et al.* 1998; Deveraux et Reed 1999). Lorsque nous l'avons testée en

immunobuvardage, seul l'antagoniste rB2 FR173657 a démontré une diminution de l'expression de XIAP (Figure 16).

Parmi les autres voies de signalisation dites anti-apoptotiques, on retrouve également la voie des MAPK ERK1/2. Les MAPKs régulent de nombreuses fonctions cellulaires incluant la prolifération, la survie cellulaire et l'apoptose (Ebbesen *et al.* 2016; Ge *et al.* 2016). Les MAPKs forment plusieurs cascades de signalisation complexes et interreliées, notamment avec les voies de p38 et JNK (Pearson *et al.* 2001). Les résultats de nos tests par immunobuvardage sur ERK 1/2 en ce qui concerne l'expression de protéines indiquent que celles-ci pourraient être impliquées dans les effets cytocides et cytotoxiques des antagonistes rB2 perméants FR173657 et NG68. En effet, ils ont tous les deux présenté une diminution de l'expression de MAPK ERK1/2 alors que l'antagoniste non perméant Hoe 140 n'a démontré aucune modulation de cette voie de signalisation (Figure 16) mais cette hypothèse reste à être confirmée.

Parmi les voies de signalisation favorisant l'apoptose, on retrouve la voie de p38, une protéine de la classe des MAPKs (Han *et al.* 1994; Goldstein et Gabriel 2005; Tudor *et al.* 2009). C'est pour cette raison que nous avons choisi de tester p38 et nous avons découvert que les antagonistes rB2 perméants n'avaient pas d'impact sur l'expression de la protéine mais provoquaient une diminution de la phosphorylation de p38 contrairement à l'antagoniste non perméant qui n'avait aucun effet sur p38. Suite à ces résultats, nous avons décidé de refaire des tests de clonogénicité avec le FR173657 et le NG68 en prétraitant les cellules avec l'inhibiteur de p38, le SB203580, pour vérifier si l'inhibition de p38 diminuait l'effet de nos antagonistes (Figure 17). Nous avons effectivement noté une diminution significative de l'effet du FR173657 et du NG68 sur le potentiel de clonogénicité de nos cellules. Nous avons également obtenu des résultats très similaires avec le NG68 dans des tests de prolifération par MTT confirmant l'implication de p38 (Figure 17).

Une autre voie proapoptotique est la voie de JNK. JNK modifie l'activité de plusieurs protéines résidentes de la mitochondrie ou du noyau en les phosphorylant, et régule des fonctions importantes telles que la croissance et la survie cellulaire (Ip et Davis 1998; Oltmanns *et al.* 2003; Vlahopoulos et Zoumpourlis 2004; Bode et Dong 2007) et c'est pourquoi cette voie devrait

également être testée.

p27<sup>Kip1</sup> est une protéine de la famille Cip/Kip des protéines inhibitrices CDK qui exerce un contrôle sur la progression du cycle cellulaire en G1 en empêchant l'activation des complexes cycline E-CDK2 et cycline D-CDK4. p27<sup>Kip1</sup> est donc considérée comme un suppresseur de tumeur puisqu'elle provoque un arrêt ou un ralentissement du cycle de division cellulaire. Dans le cas du cancer du sein, il a été démontré que les tumeurs négatives pour les récepteurs à œstrogène et progestérone et/ou ayant une mutation BRCA1/2 présentent généralement des niveaux bas de p27<sup>Kip1</sup> (Chappuis *et al.* 2000; Nakayama et Nakayama 2006; Chu *et al.* 2007; Chu *et al.* 2008; Cooper/Hausman 2009) et c'est pourquoi nous avons choisi de la tester aussi. Nos résultats d'immunobuvardage ont indiqué que les antagonistes rB2 perméants entraînaient une présence accrue de p27<sup>Kip1</sup> qui pourrait être dépendante en partie de la voie de signalisation p38 (Figure 17), ce qui est en accord avec les différents groupes qui ont démontrés la régulation de p27<sup>kip</sup> via p38 de façon directe ou indirecte (Hossain *et al.* 2012; Lontos *et al.* 2010; Pillai et Shivakumar 2011; Swat *et al.* 2009). La phosphorylation de p38 par les antagonistes rB2 perméants est relativement rapide et détectable en seulement 15 min pour le NG68 et 30 min pour le FR173657. Ces dernières données sont en accord avec les résultats obtenus avec les tests d'incorporation des antagonistes perméants (voir Tableaux 3 et 6).

La famille des cyclines est un groupe de protéines dont la fonction principale est la régulation de la progression des cellules dans le cycle cellulaire en interagissant avec les «cyclin dependent kinases» (CDKs). Des tests préliminaires de cycle cellulaire en FACS (résultats non montrés) nous ont amené à nous questionner sur la possibilité que les antagonistes perméants des kinases jouent un rôle sur l'activation des CDKs via les cyclines. La seule cycline que nous ayons testée à ce jour est la cycline A. Cette cycline joue un rôle dans la régulation de deux phases distinctes du cycle cellulaire puisqu'elle interagit avec deux CDKs différentes: CDK1 et CDK2 (Jeffrey *et al.* 1995; Coverley *et al.* 2002; Yam *et al.* 2002; Woo et Poon 2003; Weinberg 2007). Les résultats de nos immunobuvardages semblent montrer que le FR173657 et le NG68 entraînent une diminution de cette dernière mais pas le Hoe 140. Ces mêmes tests restent à faire avec les antagonistes rB1.

Dans l'ensemble, nos résultats d'immunobuvardage sur la modulation des différentes voies de signalisation par les antagonistes rB2 perméants démontrent que ces derniers diminuent l'expression de protéines reliées à l'inhibition de l'apoptose (MAPK p44/42 pour FR173657 et NG68 et XIAP pour FR173657 seulement) alors qu'ils augmentent l'activation (phosphorylation) de la voie pro-apoptotique p38 MAPK. Ces résultats viennent appuyer nos observations *in vitro* selon lesquelles les antagonistes perméants diminuent la prolifération et la survie cellulaire chez des cellules de cancer du sein. L'augmentation de l'apoptose entraînée par les antagonistes des kinines contribue à la diminution de la survie cellulaire observée. Toutefois, il est à noter que les divers antagonistes rB2 perméants testés semblent utiliser des mécanismes d'actions différents et que ces derniers ne sont pas complètement élucidés. En perspective, d'autres études devront être menées afin de promouvoir une meilleure compréhension des mécanismes d'action de chacun de ces antagonistes incluant ceux développés pour les rB1 des kinines.

Les antagonistes des kinines perméants démontrant un fort potentiel antiprolifératif et cytotoxique, nous avons voulu savoir s'ils pourraient représenter un traitement potentiel contre le cancer du sein. Nous avons donc comparé les valeurs d'IC<sub>50</sub> (la concentration nécessaire de l'agent pour induire la mort de 50% des cellules) de chacun de nos antagonistes à ceux d'agents chimiothérapeutiques déjà approuvés et utilisés en clinique dans le traitement du cancer du sein (voir Tableaux 4 et 7). Nos résultats indiquent que les antagonistes rB1 et rB2 perméants peuvent avoir des activités cytotoxiques comparables (ex. la doxorubicine et le paclitaxel) ou supérieures (ex. la carboplatine et le témozolomide) à certains agents chimiothérapeutiques. Ceci laisse croire que les antagonistes rB1 et rB2 perméants pourraient constituer à juste titre une nouvelle classe d'agents chimiothérapeutiques.

La synergie est un aspect que nous avons également étudié puisqu'en clinique, certains traitements sont parfois administrés en combinaison. En effet, il arrive souvent en clinique que des agents cytotoxiques soient donnés en combinaison de façon à cibler plusieurs mécanismes cellulaires en même temps et ainsi augmenter l'efficacité. C'est pour cette raison que nous avons testé nos antagonistes en combinaison avec des agents cytotoxiques commerciaux déjà utilisés dans le traitement du cancer du sein (voir Tableaux 5 et 8). Les tests de synergie par MTT ont démontré que nos antagonistes perméants, lorsqu'administrés en conjonction avec des agents

chimiothérapeutiques, provoquent une synergie augmentant le potentiel antitumoral de la combinaison ce qui représente une avenue très intéressante dans le traitement de tumeurs. La combinaison de deux agents ayant des modes d'action différents permettrait en effet d'élargir le spectre d'action et d'être plus efficace dans le traitement du cancer.

Un autre point à considérer dans la comparaison des antagonistes perméants des kinines avec les agents chimiothérapeutiques cliniques est la présence de mécanismes de type «multidrug resistance» ou résistance à de multiples drogues (MDR). Le concept de MDR fut introduit en 1970 par Biedler et Riehm (Biedler et Riehm 1970) et quoiqu'il existe plusieurs mécanismes de résistance, les transporteurs de la famille ABC représentent la forme la plus répandue de MDR. Les transporteurs de cette famille sont des pompes incluses dans la membrane et qui ont pour rôle de pomper les substances étrangères à l'extérieur des cellules. Bien que les MDR constituent d'abord et avant tout un système de défense et de survie des cellules contre des substances étrangères potentiellement toxiques pour elles, lorsqu'il s'agit de traitements anticancéreux, ce système de défense peut rapidement devenir un obstacle majeur au traitement. En effet, les MDR peuvent empêcher les agents chimiothérapeutiques de pénétrer à l'intérieur des cellules en les rejetant systématiquement à l'extérieur diminuant ainsi leur efficacité. Parmi les agents chimiothérapeutiques commerciaux reconnus pour être des substrats des MDR, on retrouve la doxorubicine, le paclitaxel ainsi que le cisplatine, un agent alkylant de la même famille que la carboplatine. Il est connu que les MDA-MB-231 peuvent surexprimer plusieurs types de protéines MDR (Ferreira *et al.* 2005; Hermawan *et al.* 2016), cela pourrait expliquer les valeurs d'IC<sub>50</sub> inférieures des antagonistes perméants des kinines comparativement à certains agents chimiothérapeutiques testés. Il serait donc très pertinent de faire des essais de MTT avec des inhibiteurs de ces pompes en conjugaison avec nos antagonistes perméants dans le but de voir si ces derniers sont des substrats de ces pompes. Ceci pourrait donner un indice sur la raison pour laquelle nos antagonistes perméants semblent plus efficaces *in vitro* que certains agents thérapeutiques tels que le témozolomide et la carboplatine.

**OBJECTIF 4 :** Déterminer l'impact de l'inactivation du gène des récepteurs B2 des kinines (knockdown) sur la prolifération et la viabilité des cellules MDA-MB-231 *in vitro*.

La première étape dans l'atteinte de cet objectif était l'obtention d'une inactivation des gènes des récepteurs des kinines dans les MDA-MB-231. Nous avons tout d'abord inactivé (knockdown) le gène de rB2 par la technique du shRNA. Cette méthode permet d'obtenir un mutant stable qui peut subir plusieurs passages tout en conservant l'inactivation du gène contrairement à la méthode du siRNA qui est transitoire et qui implique une nouvelle transfection des cellules à chaque expérimentation. Une fois l'inactivation du gène rB2 fait, nous nous sommes assurés de l'inactivation du gène par diverses méthodes soient le RT-qPCR, l'immunobuvardage ainsi que la cytométrie de flux (Figure 18). Dans les trois cas, les résultats ont démontré une diminution substantielle (>75%) de la présence de rB2 (ARNm et protéine) par comparaison à la lignée contrôle transfectée avec un shRNA dit «scrambled», contenant une séquence oligonucléotidique aléatoire (Figure 18, A).

Notre hypothèse de départ était que les récepteurs nucléaires des kinines jouent un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire des cellules tumorales de cancer du sein. Donc, selon cette hypothèse, une inactivation de rB2 devrait entraîner une diminution de la prolifération cellulaire ainsi qu'une diminution des effets observés des antagonistes rB2 si ces derniers sont réellement spécifiques à rB2. Les tests réalisés avec la lignée de rB2 inactivée ont confirmé cette hypothèse puisque lors des tests de MTT en prolifération, la lignée de MDA-MB-231 ayant le gène de rB2 inactivé démontrait une prolifération diminuée. Les tests de clonogénicité ont également démontré une diminution de ce dernier se traduisant par une diminution du nombre de colonies de la lignée knockdown (Figure 18, E).

Nous avons également testé l'effet de nos antagonistes perméants sur la lignée knockdown rB2 de MDA-MB-231. En effet, si nos antagonistes perméants ciblent véritablement les récepteurs des kinines de façon spécifique, alors la diminution de l'expression de rB2 devrait entraîner une diminution de l'action des antagonistes perméants sur cette lignée cellulaire. Cette hypothèse a été confirmée avec une plus faible diminution de la prolifération et de la survie chez la lignée inactivée par MTT (Figure 19).

Pour l'instant, l'objectif 4 a été réalisé avec un knockdown du gène rB2 seulement, mais il est déjà prévu de refaire le même type d'expérience avec un knockdown du gène rB1 pour compléter notre étude.

### *Discussion et perspectives*

À ce jour, peu d'études ont évalué les rôles des récepteurs des kinines dans la tumorigenèse et la progression du cancer du sein triple-négatif.

Malgré le fait que la présence de récepteurs nucléaires et le principe de signalisation intracrine sont des phénomènes connus et démontrés depuis de nombreuses années (voir revues par Gobeil *et al.* 2006a; Re et Cook 2011; Jong *et al.* 2014; Campden *et al.* 2015), le sujet demeure mal compris. Or, puisque les RCPGs intracellulaires devraient, en principe, être orientés de façon à ce que leurs domaines intracellulaires se retrouvent dans le cytoplasme, la signalisation canonique demeure possible même à l'intérieur de la cellule. La présence de récepteurs au noyau, de protéines G hétérotrimériques ainsi que plusieurs autres protéines permettant la localisation et la signalisation intracellulaire a été démontrée pour plusieurs types cellulaires (voir revues par Re et Cook 2011; Campden *et al.* 2015) et vient appuyer la possibilité de signalisation intracellulaire. De plus, la découverte du rôle des arrestines en tant que plateforme de signalisation à la fois à la membrane ainsi que dans les endosomes ouvre également la porte à une autre forme de signalisation intracrine non canonique n'impliquant pas nécessairement l'activation de protéines G (Jong *et al.* 2014). Ainsi, tous les éléments nécessaires à la signalisation intracrine sont en place.

Certaines de ces voies de signalisation intracrine associées notamment au cancer pourraient impliquer la transactivation d'EGFR nucléaires (Brand *et al.* 2013). En effet, les études réalisées à ce jour pointent vers un rôle important des EGFR nucléaires dans la prolifération tumorale et la réparation des dommages à l'ADN (Brand *et al.* 2013). Dans la revue du groupe de Brand, on discute des résultats modestes d'essais cliniques obtenus avec des inhibiteurs d'EGFR; des résultats qui pourraient s'expliquer en partie par la classe d'inhibiteurs d'EGFR utilisée (Brand *et al.* 2013). En effet, dans tous les cas les inhibiteurs utilisés étaient des anticorps or, les anticorps ne sont pas, en principe, en mesure de traverser les membranes cellulaires et d'atteindre les EGFR nucléaires. On recense également dans cette même revue, les résultats négatifs d'autres approches visant à inhiber l'internalisation d'EGFR de surface (ex. inhibition d'Akt ou, de la famille Src kinase). Ces études visant à inhiber l'internalisation d'EGFR ont été réalisées chez des lignées cellulaires ayant développé une résistance au cetuximab ou au gefitinib et entraînant une nucléarisation accrue d'EGFR ainsi qu'une augmentation de la voie d'Akt ou de Src kinase. Dans

le cas d'Akt, il a été démontré qu'une augmentation de son activité entraînait une phosphorylation de la sérine 229 d'EGFR causant sa nucléarisation, phénomène qui pouvait être inhibé par l'inhibiteur d'Akt API-2. Dans le cas de la famille Src kinase, il a été démontré que l'inhibition de SFK en particulier par le desatinab entraînait une diminution de la nucléarisation d'EGFR. Toutefois, dans les deux cas, les résultats obtenus ont été mitigés indiquant qu'il serait probablement plus simple et plus efficace de cibler les EGFR nucléaires. Tel que mentionné en introduction (voir Chapitre 1, section 4.2.2), le rB1 est capable d'induire l'activation des MAPK ERK1/2 via un mécanisme de transactivation d'EGFR dans les cellules MDA-MB-231 (Ehrenfeld *et al.* 2011). Il serait donc intéressant d'étudier s'il existe une relation (*cross-talk*) entre les récepteurs nucléaires des kinines et l'EGFR nucléaire et, le cas échéant, d'étudier les effets des antagonistes perméants des kinines sur cette voie de signalisation.

Un schéma récapitulatif des différents aspects de la signalisation des antagonistes des kinines chez les cellules MDA-MB-231 est présenté à la Figure 26.

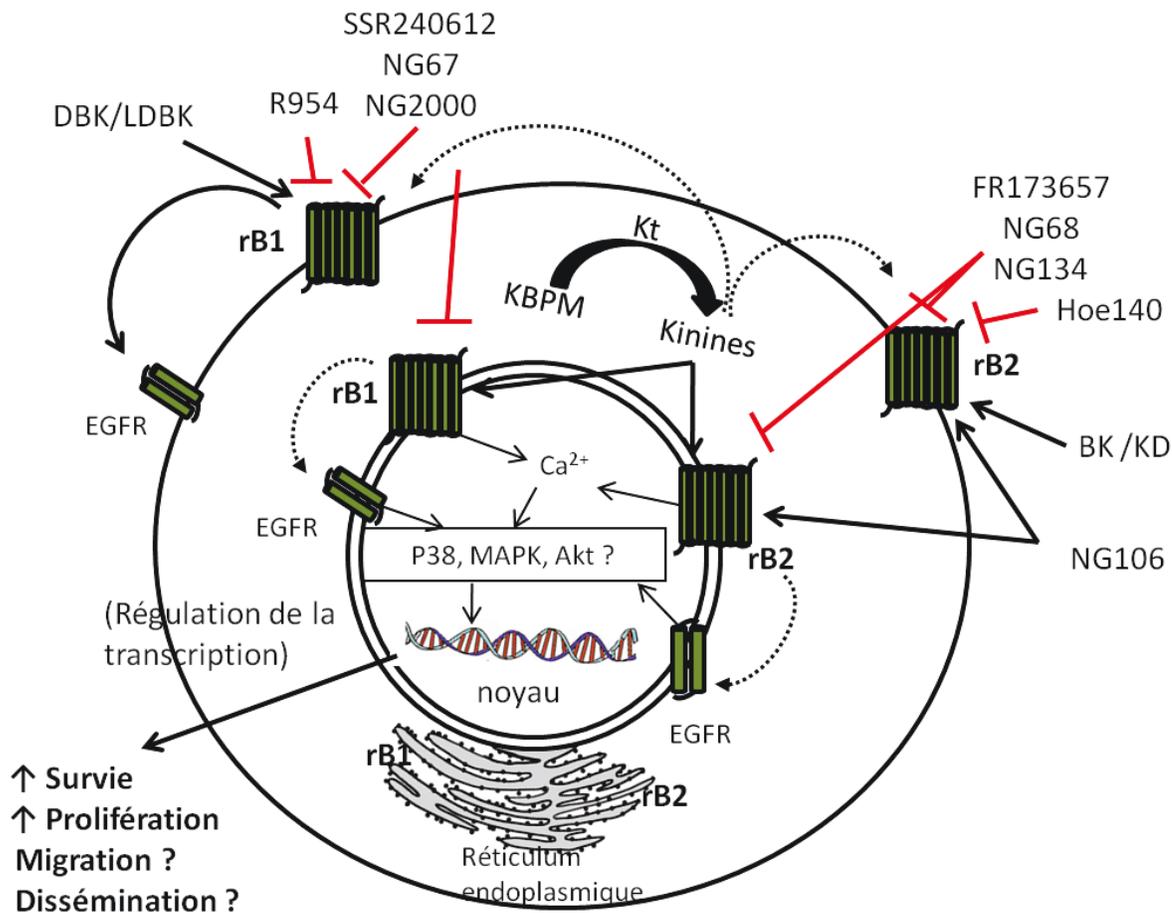


Figure 26: Modèle hypothétique des mécanismes d'action des antagonistes des kinines chez les cellules MDA-MB-231.

Les antagonistes perméants des kinines traversent la membrane plasmique et interagissent avec les récepteurs des kinines localisés au noyau. Cette interaction réduirait la signalisation des MAPK, p38, Akt et de facteurs de transcription (encore non identifiés) associés à la survie et/ou à la prolifération cellulaire des MDA-MB-231. La transactivation d'EGFR par les récepteurs des kinines pourrait également entraîner l'activation des voies Akt et MAPK, toutes deux impliquées dans la régulation de la prolifération. Une interférence dans la signalisation endosomale des rB1/rB2 par les antagonistes perméants est également possible (non montré).

Un premier point de litige concernant la signalisation intracrine est souvent l'adressage des récepteurs, ligands et autres protéines de signalisation au noyau. En effet, comment expliquer par exemple qu'une population d'un même récepteur reste à la membrane alors qu'une autre se retrouve au noyau? Ici encore, plusieurs mécanismes viennent expliquer ce phénomène. Ainsi, plusieurs groupes dont le nôtre ont démontré la présence d'un site alternatif d'initiation de la transcription qui permet un adressage des protéines au noyau plutôt qu'à la membrane (Kiefer *et al.* 1994; Savard *et al.* 2008; Xu *et al.* 2009). Tel que discuté dans les revues de Chatenet et de Campden, les modifications post-traductionnelles telles que la palmitoylation, la myristoylation ou encore la prenylation peuvent également avoir un impact sur l'adressage des récepteurs et protéines vers le noyau versus la membrane (Chatenet *et al.* 2013; Campden *et al.* 2015). Un autre point important est l'importance du pH. En effet, comme démontré par le groupe de Doan, l'internalisation du ligand urotensine II est augmentée dans un milieu extracellulaire acide (pH 6.5). Or, plusieurs pathologies dont les infarctus, l'inflammation, les plaques athérosclérotiques et le cancer entraînent souvent une diminution du pH extracellulaire et il est fort à parier que l'urotensine II n'est pas le seul ligand possédant cette caractéristique (Doan *et al.* 2012). Il ne serait donc pas surprenant de voir apparaître une forme de signalisation intracrine chez des cellules tumorales.

Un autre point de litige est également l'activation à proprement dit des récepteurs intracellulaires. Dans leur article de revue de 2014, le groupe de Jong (Jong *et al.* 2014) discute de plusieurs possibilités quant à l'activation de RCPGs intracellulaires et mentionne entre autres la possibilité de fusion avec les membranes intracellulaires de vésicules contenant le ligand pour expliquer l'activation de récepteurs intracellulaires. L'activation de RCPGs nucléaires de façon ligand indépendante par une activité constitutive demeure une autre possibilité. Ils soulignent aussi le fait que plusieurs groupes ont démontré, pour plusieurs récepteurs différents, que tant que le ligand est produit *in situ* ou encore transporté au site d'action, le récepteur peut potentiellement être activé. Toutefois, les mécanismes précis demeurent inconnus dans la majorité des cas.

L'endocytose constitue sans aucun doute une partie de la réponse concernant la signalisation intracrine. En effet, l'endosome est idéal pour agir en tant que plateforme de signalisation avec une composition biochimique distincte qui promeut le recrutement sélectif de plusieurs protéines

d'échafaudages et de médiateurs de la signalisation. De plus, puisque l'endosome communique, mais pas de manière directe avec le milieu extracellulaire, il peut permettre la prolongation d'un signal au-delà de l'exposition au ligand à la surface membranaire. L'endosome peut également servir de véhicule pour le transport physique de signaux biologiques tel que le démontre le transport rétrograde de TrkA (von Zastrow et Sorkin 2007). Il possède aussi plusieurs autres caractéristiques facilitant la signalisation dont un petit volume qui favorise la proximité et donc l'association du récepteur à son ligand ainsi que le maintien de l'activité du récepteur. Il a également un temps de résidence long pour les récepteurs actifs combinés à un «triage» lent et la possibilité d'utiliser les microtubules comme mode de transport pour se déplacer sur de longues distances et vers le noyau. Finalement, il a un pH acide (particulièrement dans l'endosome tardif) qui favorise l'activité d'enzymes protéolytiques participant à la signalisation.

L'hypothèse de la signalisation endosomale fut émise pour la première fois suite à la découverte que l'EGFR demeurait lié à son ligand, phosphorylé et actif jusqu'aux dernières étapes de son adressage endosomal et que plusieurs effecteurs de la voie de Ras lui demeureraient associés dans l'endosome (Di Guglielmo *et al.* 1994; Vieira *et al.* 1996; Jiang et Sorkin 2002; Sorkin et Von Zastrow 2002; Li *et al.* 2005).

Il fut longtemps considéré que l'internalisation endosomale des récepteurs membranaires avait pour unique but leur désensibilisation et l'arrêt de leur signalisation. Or, de plus en plus d'études démontrent, et ce pour de nombreux récepteurs dont plusieurs RCPGs, que cette internalisation ne met pas systématiquement fin à la signalisation mais au contraire, en entraîne plutôt une autre différente. En effet, il a été démontré que certains RCPGs tel que S1P<sub>1</sub> continuaient de stimuler la production d'AMPc même après leur internalisation et ce en demeurant liés à leur protéine G ainsi qu'à l'adenylyl cyclase dans le compartiment endosomal (Jalink et Moolenaar 2010). La réponse cellulaire ainsi produite est différente de celle produite à la membrane et permet un meilleur contrôle de la durée et de l'intensité de la réponse en modulant la durée totale et la localisation de cette dernière (Tsvetanova *et al.* 2015). Dans le cas du récepteur  $\beta_2$ AR, son activation à la membrane entraîne une signalisation rapide et de courte durée par le recrutement de la protéine G<sub>s</sub> alors qu'un deuxième cycle d'activation de la protéine G<sub>s</sub> (menant aussi à la production d'AMPc) peut également avoir lieu à partir de l'endosome précoce quelques

minutes après son internalisation prolongeant ainsi sa signalisation (Vilardaga *et al.* 2014). De même, DTXL3 situé dans l'endosome précoce joue un rôle important dans l'ubiquitination du complexe ESCRT jouant ainsi sur la vitesse à laquelle le récepteur CXCR4 est dirigé vers le compartiment lysosomal pour dégradation (Holleman et Marchese 2014). Les  $\beta$ -arrestines peuvent aussi entraîner une signalisation endosomale des RCPGs tel que démontré pour les récepteurs PTHR et V2R (Vilardaga *et al.* 2014). Un autre exemple est le récepteur kappa opoïde. En effet, le groupe de Bruchas a démontré que ce récepteur pouvait activer p38 via un mécanisme impliquant GRK3 et la  $\beta$ -arrestine-2 dans des astrocytes (Bruchas *et al.* 2006). En ce qui concerne les kinines, il a été démontré que rB2 peut signaler dans l'endosome via la  $\beta$ -arrestine-2 et activer la voie des MAPKs ERK 1/2 (Khoury *et al.* 2014b). Cette signalisation  $\beta$ -arrestine dépendante de rB2 dans l'endosome pourrait également être envisageable pour les rB1 comme le laisse croire les principaux résultats de l'étude du groupe de Kuhr sur l'activation post-traductionnelle de la iNOS (Kuhr *et al.* 2010).

Le clivage endoprotéolytique pourrait également représenter une forme générale de modification post-traductionnelle contribuant à la signalisation dans les endosomes comme c'est le cas pour plusieurs substrats des  $\gamma$ -sécrétases incluant le récepteur p75 de la neutrophine (Urrea *et al.* 2007). Il est déjà connu que les récepteurs des kinines subissent des modifications post-traductionnelles alors il n'est pas exclu qu'il existe un clivage endoprotéolytique quelconque entraînant une signalisation endosomale comme c'est le cas pour les  $\gamma$ -sécrétases.

Une autre découverte intéressante qui pourrait avoir un lien direct et favoriser la signalisation intracrine est une mutation de Hrs, une protéine associée à l'endosome qui promeut un «triage» des RCPGs vers les lysosomes. Il a été démontré que lorsque cette mutation survient, le recyclage à la membrane des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique et  $\mu$ -opioïdes est inhibé résultant en une internalisation des récepteurs qui demeurent alors pris dans l'endosome précoce. Ceci pourrait possiblement entraîner une signalisation intracrine (Hanyaloglu *et al.* 2005).

Outre l'internalisation endosomale suite à la liaison avec le ligand, il a également été démontré que certains récepteurs pouvaient être internalisés sans liaison préalable à leur ligand lors de mutations ponctuelles. Cette forme d'internalisation sans ligand est dite constitutive et,

quoiqu'elle ne soit pas encore complètement élucidée, semble être différente de l'internalisation ligand-dépendante. En effet, le récepteur du thromboxane  $A_2\beta$  subit une internalisation par vésicule de clathrine dépendante des GRKs, des arrestines et de la dynamine lorsqu'il est lié à son ligand alors que son internalisation constitutive se fait par des vésicules de clathrines non dépendantes des GRKs et des arrestines (Reid et Kinsella 2007). C'est également le cas pour les récepteurs  $TP\beta$  et  $mGluR1a$  (Dale *et al.* 2001; Reid et Kinsella 2007). Une autre différence entre l'internalisation avec ligand versus constitutive est le sort du récepteur en question. Ainsi, lorsque le récepteur PAR1 est internalisé de façon ligand-dépendante, cela entraîne une dégradation de PAR1 alors qu'une internalisation constitutive entraîne plutôt un recyclage à la membrane de ce dernier (Shapiro et Coughlin 1998). L'internalisation constitutive des RCPGs fournit donc une explication à la présence de récepteurs à l'intérieur de cellules et vient une fois de plus appuyer la possibilité de signalisation intracrine.

### *Perspectives de l'étude*

Les récepteurs des kinines et leur impact au niveau du cancer représentent un vaste domaine d'étude possédant plusieurs ramifications qu'il est impossible d'explorer complètement et uniquement dans le cadre d'un projet de doctorat. C'est pourquoi il reste donc de nombreuses avenues à explorer qui seront brièvement discutées ici. Ce qui est sûr c'est que nos antagonistes perméants sont très intéressants du fait qu'ils ciblent des récepteurs spécifiques surexprimés chez des cellules cancéreuses. Ceci augmenterait la spécificité de traitement et pourrait avoir un impact majeur sur la diminution des effets secondaires indésirables entraînés par les agents chimiothérapeutiques classiques. Le rB1 est particulièrement intéressant puisqu'il n'est pas exprimé de manière constitutive contrairement au rB2 réduisant ainsi les chances d'effets indésirables liés à son utilisation. Les antagonistes rB2 n'en demeurent pas moins intéressants, mais le mode d'administration et le dosage devront être minutieusement établis.

L'étude du MDR et de ses interactions avec les antagonistes perméants des kinines représente une perspective intéressante, car toutes les lignées de cancer du sein étudiées ont démontré la présence d'une ou plusieurs pompes du MDR. Ceci montre bien l'importance de ce système dans la survie cellulaire et la progression tumorale et donc par extension, dans le design de nouvelles molécules pour le traitement du cancer.

Finalement, une étude animale exhaustive est la suite logique de cette étude et permettrait de valider les résultats obtenus *in vitro*. Elle permettrait également de déterminer le réel potentiel des antagonistes des kinines en tant que traitement anticancéreux ainsi qu'identifier les effets secondaires reliés. À cet égard, nous avons mené une étude *in vivo* préliminaire avec un modèle animal murin de xénogreffe sous-cutanée de tumeur MDA-MB-231 (ANNEXE 2). Les résultats obtenus à ce jour semblent concorder avec ceux *in vitro*. On a pu constater une nette tendance de diminution dans la croissance tumorale et l'activité métabolique chez une tumeur knockdown du gène de rB2 (shRNA1) ainsi que chez les tumeurs MDA-MB-231 ayant subi un traitement avec l'antagoniste rB2 perméant FR173657 (ANNEXE 2). Il faudra bien sûr attendre la fin de l'étude avant de pouvoir se prononcer définitivement sur l'efficacité des antagonistes perméants des kinines en tant que nouveaux agents anticancéreux.

Il est à noter qu'il existe très peu d'études sur les fonctions des RCPG nucléaires *in vivo*. Dans ce contexte, le groupe de Joyal fut le premier à démontrer un rôle *in vivo* des RCPG nucléaires de la trypsine, soit le récepteur de type 1 du facteur II de coagulation F2RL1 ou Par2, dans le développement rétinien et la rétinopathie ischémique (Joyal *et al.* 2014). En 2016, une autre étude du groupe de Vincent (Vincent *et al.* 2016) a démontré un rôle *in vivo* des récepteurs mGluR5 nucléaires dans la douleur neuropathique. Dans les deux cas, l'utilisation de composés agonistes/antagonistes perméants s'est avéré fort utile pour la démonstration claire des fonctions nucléaires des RCPGs.

Aussi, l'application des données *in vivo* dans un contexte clinique reste à faire non seulement dans le domaine du cancer mais aussi pour tous autres physiopathologies dont l'expression nucléaire des rB1 et rB2 a été révélée (Savard *et al.* 2008). Dans ce contexte, une étude récente a mis en évidence une sous-expression des rB2 nucléaires dans la gestation pré-éclampsique humaine (Valdes *et al.* 2016).

En ce qui concerne le concept de signalisation intracrine, ce dernier gagne en popularité depuis les vingt dernières années et les connaissances et les découvertes sur le sujet se multiplient à grande vitesse. Une grande partie de ce concept repose sur la présence de récepteurs nucléaires actifs et les RCPGs n'y échappent pas. En effet, la liste d'exemples de RCPGs fonctionnels au noyau augmente sans cesse (Gobeil *et al.* 2006a; Re et Cook 2011; Tadevosyan *et al.* 2012; Joyal *et al.* 2014). Ces récepteurs assurent plusieurs fonctions au sein de nombreux organes comme le cœur, le cerveau, les reins, le système vasculaire ou encore digestif. Il apparaît donc important de poursuivre l'étude de la signalisation intracrine des RCPGs dans tous ses aspects (élucidation des bases d'adressage intracellulaire, mécanistique d'activation, et d'actions biologiques) pour une meilleure compréhension de ces systèmes en contexte physiologique et physiopathologique (par exemple: cancer). Une meilleure compréhension du mode de signalisation intracrine des RCPGs pourrait permettre ultimement de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques agissant de manière plus spécifique.

### *Conclusion de l'étude*

Cette étude a permis d'identifier et de valider un nouveau modèle de cancer du sein pour l'étude *in vitro* des récepteurs des kinines. C'est par l'utilisation des MDA-MB-231, une lignée de cellules de cancer du sein humain triple-négative, que nous avons pu mettre en évidence la présence de récepteurs des kinines et étudier leurs effets sur la progression tumorale. Au-delà de la présence des récepteurs des kinines, nous avons aussi mis en lumière la présence de toutes les composantes du SKK à l'intérieur de ces cellules appuyant ainsi la théorie de l'action intracrine. Nous avons également développé et caractérisé de nouveaux antagonistes perméants des kinines démontrant qu'il est possible d'améliorer les antagonistes disponibles pour les rendre plus efficaces. Notre modèle de cancer du sein ainsi que les antagonistes perméants développés dans notre laboratoire nous ont permis de valider nos hypothèses concernant la présence de rB1 et rB2 intracellulaires/nucléaires chez des cellules tumorales du sein ainsi que le rôle de ces derniers dans le développement et le traitement de ce type de cancer. Nous avons même poussé encore plus loin notre hypothèse et nos objectifs de départ en testant d'autres types de cellules tumorales. Ainsi, nous avons découvert que des cellules de cancer colorectal, du poumon et du cerveau exprimaient aussi ces récepteurs et que nos antagonistes perméants avaient un effet antiprolifératif chez ces cellules (résultats non montrés). Ceci suggère qu'ils pourraient être efficaces dans le traitement de plusieurs types de cancers et pas seulement le cancer du sein. De plus, la puissance et l'activité de nos composés perméants sont comparables et même synergiques aux agents chimiothérapeutiques utilisés en clinique dans le traitement du cancer suggérant un potentiel anti tumoral pour les antagonistes perméants.

En conclusion, nos résultats montrent un rôle central des récepteurs intracellulaires/nucléaires des kinines dans la prolifération et le maintien de la viabilité des cellules de cancer du sein triple-négatives. Les données obtenues montrent également l'importance de cibler un RCPG en fonction de sa localisation subcellulaire pour obtenir une meilleure efficacité dans le traitement du cancer.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Pr. Fernand Gobeil de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ce projet de recherche qui me tenait à cœur et de m'avoir donné la chance de me dépasser et d'approfondir mes connaissances et mon expérience dans un domaine qui me passionne toujours autant.

Un merci particulier à toute l'équipe du laboratoire du Pr. Gobeil et ses collaborateurs, en particulier Martin Savard, Véronica Bovenzi, Witold Neugebauer, Jérôme Côté, et Maude Gagnon-Auger pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée dans leurs divers champs de compétences mais également pour tous les bons moments et les fous rires passés en leur compagnie. Merci aussi à tous les membres du département de pharmacologie, collègues et amis qui ont rendu cette expérience inoubliable.

Je veux également remercier les membres du jury, Pr Fernand Gobeil, Pr Benoit Boivin, Pr. Marie-Josée Boucher et Pr Michel Grandbois d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Finalement, je tiens à remercier ma famille qui m'a toujours supportée et encouragée dans cette belle aventure.

Merci beaucoup à tous!

*Céléna*

## RÉFÉRENCES

Adam, A., J. Closset and J. Damas (1985). "A convenient purification method for high and low molecular weight human kininogens." *Mol. Physiol.* **7**: 177-184.

Alhenc-Gelas, F., N. Bouby, C. Richer, L. Potier, R. Roussel and M. Marre (2011). "Kinins as therapeutic agents in cardiovascular and renal diseases." *Curr Pharm Des* **17**(25): 2654-62.

Altomare, D. A. and J. R. Testa (2005). "Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer." *Oncogene* **24**(50): 7455-64.

Alves, I. D., I. Correia, C. Y. Jiao, E. Sachon, S. Sagan, S. Lavielle, G. Tollin and G. Chassaing (2009). "The interaction of cell-penetrating peptides with lipid model systems and subsequent lipid reorganization: thermodynamic and structural characterization." *J Pept Sci* **15**(3): 200-9.

Assis, D. M., L. Juliano, T. Paschoalin, M. Kouyoumdjian, J. B. Calixto, R. A. Santos, T. A. Pertinhez, F. Gauthier, T. Moreau, M. Blaber and M. A. Juliano (2015). "Pharmacological Activities and Hydrolysis by Peptidases of [Phospho-Ser(6)]-Bradykinin (pS(6)-BK)." *Biochem Pharmacol* **97**(2): 203-14.

Austin, C. E., A. Faussner, H. E. Robinson, S. Chakravarty, D. J. Kyle, J. M. Bathon and D. Proud (1997). "Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways." *J Biol Chem* **272**(17): 11420-5.

Avgeris, M., K. Mavridis and A. Scorilas (2012). "Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance." *Biol Chem* **393**(5): 301-17.

Baba, K. and O. Yamaguchi (2001). "Effects of bradykinin on cytoplasmic calcium and motility in murine bladder tumor cells." *J. Urol.* **165**: 259-262.

Bachvarov, D. R., S. Houle, M. Bachvarova, J. Bouthillier, A. Adam and F. Marceau (2001). "Bradykinin B(2) receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates." *J Pharmacol Exp Ther* **297**(1): 19-26.

Barki-Harrington, L., A. L. Bookout, G. Wang, M. E. Lamb, L. M. Leeb-Lundberg and Y. Daaka (2003). "Requirement for direct cross-talk between B1 and B2 kinin receptors for the proliferation of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells." *Biochem J* **371**(Pt 2): 581-7.

Barki-Harrington, L. and Y. Daaka (2001). "Bradykinin induced mitogenesis of androgen independent prostate cancer cells." *J Urol* **165**(6 Pt 1): 2121-5.

Barth, M., M. Bondoux, J. M. Luccarini, V. Peyrou, P. Dodey, D. Pruneau, C. Massardier and J. L. Paquet (2012). "From bradykinin B2 receptor antagonists to orally active and selective bradykinin B1 receptor antagonists." *J Med Chem* **55**(6): 2574-84.

Bascands, J. L., C. Pecher, S. Rouaud, C. Emond, J. L. Tack, M. J. Bastie, R. Burch, D. Regoli and J. P. Girolami (1993). "Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells." *Am J Physiol* **264**(3 Pt 2): F548-56.

Bathon, J. M., D. C. Manning, D. W. Goldman, M. C. Towns and D. Proud (1992). "Characterization of kinin receptors on human synovial cells and upregulation of receptor number by interleukin-1." *J Pharmacol Exp Ther* **260**(1): 384-92.

Bawolak, M. T., R. Lodge, G. Morissette and F. Marceau (2011). "Bradykinin B(2) receptor-mediated transport into intact cells: anti-receptor antibody-based cargoes." *Eur J Pharmacol* **668**(1-2): 107-14.

Bechara, C. and S. Sagan (2013). "Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?" *FEBS Lett* **587**(12): 1693-702.

Bélanger, S. (2008). Nouveaux agonistes des récepteurs B2 des kinines avec profil pharmacologique amélioré. *Pharmacologie*. Sherbrooke, Qc, Canada, Université de Sherbrooke. **Mémoire de maîtrise.**

Bélanger, S., V. Bovenzi, J. Cote, W. Neugebauer, M. Amblard, J. Martinez, B. Lammek, M. Savard and F. Gobeil, Jr. (2009). "Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor." *Peptides* **30**(4): 777-87.

Bellacosa, A., C. C. Kumar, A. Di Cristofano and J. R. Testa (2005). "Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting." *Adv Cancer Res* **94**: 29-86.

Bhoola, K. D., C. D. Figueroa and K. Worthy (1992). "Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases." *Pharmacol Rev* **44**(1): 1-80.

Biedler, J. L. and H. Riehm (1970). "Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies." *Cancer Res* **30**(4): 1174-84.

Bkaily, G., J. Al-Khoury and D. Jacques (2014). "Nuclear membranes GPCRs: implication in cardiovascular health and diseases." *Curr Vasc Pharmacol* **12**(2): 215-22.

Bkaily, G., S. Sleiman, J. Stephan, C. Asselin, S. Choufani, M. Kamal, D. Jacques, F. Gobeil, Jr. and P. D'Orleans-Juste (2003). "Angiotensin II AT1 receptor internalization, translocation and de novo synthesis modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells." *Can J Physiol Pharmacol* **81**(3): 274-87.

Blaukat, A. (2003). "Structure and signalling pathways of kinin receptors." *Andrologia* **35**(1): 17-23.

Blaukat, A., S. A. Alla, M. J. Lohse and W. Muller-Esterl (1996). "Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts." *J Biol Chem* **271**(50): 32366-74.

Blaukat, A., A. Barac, M. J. Cross, S. Offermanns and I. Dikic (2000). "G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals." *Mol Cell Biol* **20**(18): 6837-48.

Blaukat, A. and I. Dikic (2001). "Activation of sphingosine kinase by the bradykinin B2 receptor and its implication in regulation of the ERK/MAP kinase pathway." *Biol Chem* **382**(1): 135-9.

Blaukat, A., K. Herzer, C. Schroeder, M. Bachmann, N. Nash and W. Muller-Esterl (1999). "Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation." *Biochemistry* **38**(4): 1300-9.

Bode, A. M. and Z. Dong (2007). "The functional contrariety of JNK." *Mol Carcinog* **46**(8): 591-8.

Boivin, B., G. Vaniotis, B. G. Allen and T. E. Hebert (2008). "G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm?" *J Recept Signal Transduct Res* **28**(1-2): 15-28.

Bolhassani, A. (2011). "Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer." *Biochim Biophys Acta* **1816**(2): 232-46.

Booz, G. W., K. M. Conrad, A. L. Hess, H. A. Singer and K. M. Baker (1992). "Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei." *Endocrinology* **130**(6): 3641-9.

Bovenzi, V., M. Savard, J. Morin, C. M. Cuerrier, M. Grandbois and F. Gobeil, Jr. (2010). "Bradykinin protects against brain microvascular endothelial cell death induced by pathophysiological stimuli." *J Cell Physiol* **222**(1): 168-76.

Boyle, P. (2012). "Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations." *Ann Oncol* **23 Suppl 6**: vi7-12.

Bozo, E., J. Eles and G. M. Keseru (2012). "Bradykinin B1 receptor antagonists: a patent update 2009 - 2012." *Expert Opin Ther Pat* **22**(12): 1443-52.

Brand, T. M., M. Iida, N. Luthar, M. M. Starr, E. J. Huppert and D. L. Wheeler (2013). "Nuclear EGFR as a molecular target in cancer." *Radiother Oncol* **108**(3): 370-7.

Brault, S., F. Gobeil, Jr., A. Fortier, J. C. Honore, J. S. Joyal, P. S. Sapiha, A. Kooli, E. Martin, P. Hardy, A. Ribeiro-da-Silva, K. Peri, P. Lachapelle, D. Varma and S. Chemtob (2007). "Lysophosphatidic acid induces endothelial cell death by modulating the redox environment." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**(3): R1174-83.

Brechter, A. B., E. Persson, I. Lundgren and U. H. Lerner (2008). "Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases." *Bone* **43**(1): 72-83.

Brooks, H., B. Lebleu and E. Vives (2005). "Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics." *Adv Drug Deliv Rev* **57**(4): 559-77.

Bruchas, M. R., T. A. Macey, J. D. Lowe and C. Chavkin (2006). "Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3- and arrestin-dependent in neurons and astrocytes." *J Biol Chem* **281**(26): 18081-9.

Burch, R. M. and J. Axelrod (1987). "Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(18): 6374-8.

Burch, R. M., J. R. Connor and C. W. Tiffany (1989). "The kallikrein-kininogen-kinin system in chronic inflammation." *Agents Actions* **27**(3-4): 258-60.

Campden, R., N. Audet and T. E. Hebert (2015). "Nuclear G protein signaling: new tricks for old dogs." *J Cardiovasc Pharmacol* **65**(2): 110-22.

Cardoso, R. C., B. Lobao-Soares, M. M. Bianchin, C. G. Carlotti, Jr., R. Walz, M. Alvarez-Silva, A. G. Trentin and M. Nicolau (2004). "Enhancement of blood-tumor barrier permeability by Sar-[D-Phe<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK, a metabolically resistant bradykinin B1 agonist, in a rat C6 glioma model." *BMC Neurosci*, **5**: 38.

Cascales, L., S. T. Henriques, M. C. Kerr, Y. H. Huang, M. J. Sweet, N. L. Daly and D. J. Craik (2011). "Identification and characterization of a new family of cell-penetrating peptides: cyclic cell-penetrating peptides." *J Biol Chem* **286**(42): 36932-43.

Chakir, M., D. Regoli, P. Sirois, F. Gobeil and G. E. Plante (1996). Hypersensibilité du récepteur B1 de la bradykinine au niveau au niveau de la veine porte de rat spontanément hypertendu (SHR). CRCQ.

Chan, D., L. Gera, J. Stewart, B. Helfrich, M. Verella-Garcia, G. Johnson, A. Baron, J. Yang, T. Puck and P. Bunn, Jr. (2002). "Bradykinin antagonist dimer, CU201, inhibits the growth of human lung cancer cell lines by a "biased agonist" mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4608-13.

Chang, P. H., Y. P. Pan, C. W. Fan, W. K. Tseng, J. S. Huang, T. H. Wu, W. C. Chou, C. H. Wang and K. Y. Yeh (2016). "Pretreatment serum interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha levels predict the progression of colorectal cancer." *Cancer Med*, **5**(3): 426-33.

Chappuis, P. O., L. Kapusta, L. R. Begin, N. Wong, J. S. Brunet, S. A. Narod, J. Slingerland and W. D. Foulkes (2000). "Germline BRCA1/2 mutations and p27(Kip1) protein levels independently predict outcome after breast cancer." *J Clin Oncol* **18**(24): 4045-52.

Charest-Morin, X., J. P. Fortin, M. T. Bawolak, R. Lodge and F. Marceau (2013). "Green fluorescent protein fused to peptide agonists of two dissimilar G protein-coupled receptors: novel ligands of the bradykinin B2 (rhodopsin family) receptor and parathyroid hormone PTH1 (secretin family) receptor." *Pharmacol Res Perspect* **1**(1): p1-13.

Chatenet, D., T. T. Nguyen, M. Letourneau and A. Fournier (2013). "Update on the urotensinergic system: new trends in receptor localization, activation, and drug design." *Front Endocrinol* **3**(174): 1-13.

Chavez, K. J., S. V. Garimella and S. Lipkowitz (2010). "Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer." *Breast Dis* **32**(1-2): 35-48.

Chee, J., A. Naran, N. L. Misso, P. J. Thompson and K. D. Bhoola (2008). "Expression of tissue and plasma kallikreins and kinin B1 and B2 receptors in lung cancer." *Biol Chem* **389**(9): 1225-33.

Chee, J., J. Singh, A. Naran, N. L. Misso, P. J. Thompson and K. D. Bhoola (2007). "Novel expression of kallikreins, kallikrein-related peptidases and kinin receptors in human pleural mesothelioma." *Biol Chem* **388**(11): 1235-42.

Chen, E. Y., D. F. Emerich, R. T. Bartus and J. H. Kordower (2000). "B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain." *J Comp Neurol* **427**(1): 1-18.

Chen, Y. H., M. W. Zhao, W. Z. Yao, Y. Z. Pang and C. S. Tang (2004). "The signal transduction pathway in the proliferation of airway smooth muscle cells induced by urotensin II." *Chin Med J (Engl)* **117**(1): 37-41.

Christopher, J., V. Velarde and A. A. Jaffa (2001). "Induction of B(1)-kinin receptors in vascular smooth muscle cells: cellular mechanisms of map kinase activation." *Hypertension* **38**(3 Pt 2): 602-5.

Chu, I., J. Sun, A. Arnaout, H. Kahn, W. Hanna, S. Narod, P. Sun, C. K. Tan, L. Hengst and J. Slingerland (2007). "p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2." *Cell* **128**(2): 281-94.

Chu, I. M., L. Hengst and J. M. Slingerland (2008). "The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy." *Nat Rev Cancer* **8**(4): 253-67.

Cicardi, M. and M. Cugno (2012). Kallikrein-kinin system in angioedema. *Kinins*. M. Bader. (ed) Berlin: 289-300.

Ciruelos Gil, E. M. (2012). "Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer." *Cancer Treat Rev* **40**(7): 862-71.

Cooper, G., and R. Hausman (2009). *The cell: a molecular approach*. Boston, Boston University: ASM Press (ed), 6<sup>th</sup> edition, 669 p.

Costa-Neto, C. M., D. A. Duarte, V. Lima, A. G. Maria, E. C. Prando, D. Y. Rodriguez, G. A. Santos, P. P. Souza and E. S. L. T. Parreiras (2014). "Non-canonical signalling and roles of the vasoactive peptides angiotensins and kinins." *Clin Sci (Lond)* **126**(11): 753-74.

Côté, J. (2007). Développement de nouveaux agonistes du récepteur B1 des kinines à profil pharmacologique amélioré et leur utilité pour l'ouverture sélective de la barrière hémato-encéphalique dans un modèle de glioblastome de rat. *Pharmacologie*. Sherbrooke, Qc, Canada, Université de sherbrooke. **Mémoire de maîtrise**.

Côté, J., V. Bovenzi, M. Savard, C. Dubuc, A. Fortier, W. Neugebauer, L. Tremblay, W. Muller-Esterl, A. M. Tsanaclis, M. Lepage, D. Fortin and F. Gobeil, Jr. (2012). "Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model." *PLoS One* **7**(5): e37485.

Côté, J., M. Savard, V. Bovenzi, S. Belanger, J. Morin, W. Neugebauer, A. Larouche, C. Dubuc and F. Gobeil, Jr. (2009). "Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles." *Peptides* **30**(4): 788-95.

Côté, J., M. Savard, V. Bovenzi, C. Dubuc, L. Tremblay, A. M. Tsanaclis, D. Fortin, M. Lepage and F. Gobeil, Jr. (2010). "Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe(8)psi(CH<sub>2</sub>)NH)Arg(9)]-BK in a F98 glioma rat model: an MRI study." *Neuropeptides* **44**(2): 177-85.

Côté, J., M. Savard, W. Neugebauer, D. Fortin, M. Lepage and F. Gobeil (2013). "Dual kinin B1 and B2 receptor activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and anticancer drug delivery into brain tumors." *Cancer Biol Ther* **14**(9): 806-11.

Couture, R., N. Blaes and J. P. Girolami (2014). "Kinin receptors in vascular biology and pathology." *Curr Vasc Pharmacol* **12**(2): 223-48.

Couture, R., M. Harrisson, R. M. Vianna and F. Cloutier (2001). "Kinin receptors in pain and inflammation." *Eur J Pharmacol* **429**(1-3): 161-76.

Couture, R., J. Mizrahi, D. Regoli and G. Devroede (1981). "Peptides and the human colon: an in vitro pharmacological study." *Can J Physiol Pharmacol* **59**(9): 957-64.

Coverley, D., H. Laman and R. A. Laskey (2002). "Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation." *Nat Cell Biol* **4**(7): 523-8.

D'Orleans-Juste, P., G. de Nucci and J. R. Vane (1989). "Kinins act on B1 or B2 receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells." *Br J Pharmacol* **96**(4): 920-6.

da Costa, P. L., P. Sirois, I. F. Tannock and R. Chammas (2014). "The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities." *Cancer Lett* **345**(1): 27-38.

Dale, L. B., M. Bhattacharya, J. L. Seachrist, P. H. Anborgh and S. S. Ferguson (2001). "Agonist-stimulated and tonic internalization of metabotropic glutamate receptor 1a in human embryonic

kidney 293 cells: agonist-stimulated endocytosis is beta-arrestin1 isoform-specific." *Mol Pharmacol* **60**(6): 1243-53.

Davies, J. Q., H. H. Lin, M. Stacey, S. Yona, G. W. Chang, S. Gordon, J. Hamann, L. Campo, C. Han, P. Chan and S. B. Fox (2010). "Leukocyte adhesion-GPCR EMR2 is aberrantly expressed in human breast carcinomas and is associated with patient survival." *Oncol Rep* **25**(3): 619-27.

Davies, J. Q., H. H. Lin, M. Stacey, S. Yona, G. W. Chang, S. Gordon, J. Hamann, L. Campo, C. Han, P. Chan and S. B. Fox (2011). "Leukocyte adhesion-GPCR EMR2 is aberrantly expressed in human breast carcinomas and is associated with patient survival." *Oncol Rep* **25**(3): 619-27.

Decarie, A., P. Raymond, N. Gervais, R. Couture and A. Adam (1996). "Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg<sup>9</sup>]BK: influence of enalaprilat." *Am J Physiol* **271**(4 Pt 2): H1340-7.

Dent, R., M. Trudeau, K. I. Pritchard, W. M. Hanna, H. K. Kahn, C. A. Sawka, L. A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun and S. A. Narod (2007). "Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence." *Clin Cancer Res* **13**(15 Pt 1): 4429-34.

Deshayes, S., M. C. Morris, G. Divita and F. Heitz (2005). "Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics." *Cell Mol Life Sci* **62**(16): 1839-49.

Desposito, D., L. Potier, C. Chollet, F. Gobeil, Jr., R. Roussel, F. Alhenc-Gelas, N. Bouby and L. Waeckel (2015). "Kinin receptor agonism restores hindlimb postischemic neovascularization capacity in diabetic mice." *J Pharmacol Exp Ther* **352**(2): 218-26.

Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-52.

Di Guglielmo, G. M., P. C. Baass, W. J. Ou, B. I. Posner and J. J. Bergeron (1994). "Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma." *Embo J* **13**(18): 4269-77.

Dillenburg-Pilla, P., A. G. Maria, R. I. Reis, E. M. Floriano, C. D. Pereira, F. L. De Lucca, S. G. Ramos, J. B. Pesquero, M. G. Jasiulionis and C. M. Costa-Neto (2013). "Activation of the kinin B1 receptor attenuates melanoma tumor growth and metastasis." *PLoS One* **8**(5): e64453.

Dixon, B. S., D. Evanoff, W. B. Fang and M. J. Dennis (2002). "Bradykinin B1 receptor blocks PDGF-induced mitogenesis by prolonging ERK activation and increasing p27Kip1." *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(1): C193-203.

Dlamini, Z. and K. Bhoola (2005a). "Esophageal cancer in African blacks of Kwazulu Natal, South Africa: an epidemiological brief." *Ethn Dis* **15**(4): 786-9.

Dlamini, Z. and K. D. Bhoola (2005b). "Upregulation of tissue kallikrein, kinin B1 receptor, and kinin B2 receptor in mast and giant cells infiltrating oesophageal squamous cell carcinoma." *J Clin Pathol* **58**(9): 915-22.

Doan, N. D., T. T. Nguyen, M. Letourneau, K. Turcotte, A. Fournier and D. Chatenet (2012). "Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart." *Br J Pharmacol* **166**(1): 243-57.

Dominek, P., P. Campagnolo, H. Z. M, N. Krankel, M. Chilosi, J. A. Sharman, A. Caporali, G. Mangialardi, G. Spinetti, C. Emanuelli, M. Pignatelli and P. Madeddu (2010). "Role of human tissue kallikrein in gastrointestinal stromal tumour invasion." *Br J Cancer* **103**(9): 1422-31.

Don-Salu-Hewage, A. S., S. Y. Chan, K. M. McAndrews, M. A. Chetram, M. R. Dawson, D. A. Bethea and C. V. Hinton (2013). "Cysteine (C)-x-C receptor 4 undergoes transportin 1-dependent nuclear localization and remains functional at the nucleus of metastatic prostate cancer cells." *PLoS One* **8**(2): e57194.

Dorsam, R. T. and J. S. Gutkind (2007). "G-protein-coupled receptors and cancer." *Nat Rev Cancer* **7**(2): 79-94.

Drapeau, G., D. deBlois and F. Marceau (1991). "Hypotensive effects of Lys-des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins." *J Pharmacol Exp Ther* **259**(3): 997-1003.

Drapeau, G., N. E. Rhaleb, S. Dion, D. Jukic and D. Regoli (1988). "[Phe<sup>8</sup> psi(CH<sub>2</sub>-NH)Arg<sup>9</sup>]bradykinin, a B2 receptor selective agonist which is not broken down by either kininase I or kininase II." *Eur J Pharmacol* **155**(1-2): 193-5.

Dray, A. and M. Perkins (1993). "Bradykinin and inflammatory pain." *Trends Neurosci* **16**(3): 99-104.

Drin, G., S. Cottin, E. Blanc, A. R. Rees and J. Tamsamani (2003). "Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides." *J Biol Chem* **278**(33): 31192-201.

Drouin, J. N., P. Gaudreau, S. St-Pierre and D. Regoli (1979a). "Biological activities of kinins modified at the N- or at the C-terminal end." *Can J Physiol Pharmacol* **57**(9): 1018-23.

Drouin, J. N., P. Gaudreau, S. A. St-Pierre and D. Regoli (1979b). "Structure-activity studies of [des-Arg<sup>9</sup>]-bradykinin on the B1 receptor of the rabbit aorta." *Can J Physiol Pharmacol* **57**(6): 562-6.

Dubuc, C., M. Savard, V. Bovenzi, W. Neugebauer and F. Gobeil (2012a). "Arrêt de la prolifération et induction de l'apoptose des cellules humaines de cancer du sein par des antagonistes perméants des récepteurs B2 de la bradykinine." 54<sup>e</sup> réunion annuelle, Club de recherche clinique du Québec. Programme et abrégées, p.124.

Dubuc, C., V. Bovenzi, M. Savard, W. Neugebauer and F. Gobeil (2012b). "Induction of growth arrest and apoptosis of human breast cancer cells with cell-penetrating kinin B2 receptor antagonists". Kinin 2012, Paris, Programme, p.50.

Dubuc, C., M. Savard, V. Bovenzi and F. Gobeil (2013). "Étude de l'expression des récepteurs B1 des kinines chez différentes lignées de cancer du sein humain." 55<sup>e</sup> réunion annuelle, Club de recherche clinique du Québec. Programme et abrégés, p. 151.

Duckett, C. S., F. Li, Y. Wang, K. J. Tomaselli, C. B. Thompson and R. C. Armstrong (1998). "Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c." *Mol Cell Biol* **18**(1): 608-15.

Duckett, C. S., V. E. Nava, R. W. Gedrich, R. J. Clem, J. L. Van Dongen, M. C. Gilfillan, H. Shiels, J. M. Hardwick and C. B. Thompson (1996). "A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors." *Embo J* **15**(11): 2685-94.

Ebbesen, S. H., M. Scaltriti, C. U. Bialucha, N. Morse, E. R. Kasthuber, H. Y. Wen, L. E. Dow, J. Baselga and S. W. Lowe (2016). "Pten loss promotes MAPK pathway dependency in HER2/neu breast carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113** (11): 3030-3035.

Eggena, P., J. H. Zhu, K. Clegg and J. D. Barrett (1993). "Nuclear angiotensin receptors induce transcription of renin and angiotensinogen mRNA." *Hypertension* **22**(4): 496-501.

Ehrenfeld, P., I. Conejeros, M. F. Pavicic, C. E. Matus, C. B. Gonzalez, A. F. Quest, K. D. Bhoola, M. T. Poblete, R. A. Burgos and C. D. Figueroa (2011). "Activation of kinin B1 receptor increases the release of metalloproteases-2 and -9 from both estrogen-sensitive and -insensitive breast cancer cells." *Cancer Lett* **301**(1): 106-18.

Ehrenfeld, P., Figueroa C.D., Bhoola K.D., Matus C.E. (2012). Signaling Pathways Coupled to Activation of the Kinin B1 Receptor. Advances in protein kinases. G. D. S. Xavier. (ed), London, Intech: 109-130.

Ehrenfeld, P., L. Manso, M. F. Pavicic, C. E. Matus, C. Borquez, A. Lizama, J. Sarmiento, M. T. Poblete, K. D. Bhoola, A. Naran and C. D. Figueroa (2014). "Bioregulation of kallikrein-related peptidases 6, 10 and 11 by the kinin B(1) receptor in breast cancer cells." *Anticancer Res* **34**(12): 6925-38.

Ehrenfeld, P., C. E. Matus, F. Pavicic, C. Toledo, F. Nualart, C. B. Gonzalez, R. A. Burgos, K. D. Bhoola and C. D. Figueroa (2009). "Kinin B1 receptor activation turns on exocytosis of matrix metalloprotease-9 and myeloperoxidase in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase family." *J Leukoc Biol* **86**(5): 1179-89.

Ehrenfeld, P., C. Millan, C. E. Matus, J. E. Figueroa, R. A. Burgos, F. Nualart, K. D. Bhoola and C. D. Figueroa (2006). "Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils." *J Leukoc Biol* **80**(1): 117-24.

Emerich, D. F., R. L. Dean, C. Osborn and R. T. Bartus (2001). "The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation." *Clin Pharmacokinet* **40**(2): 105-23.

Esseghir, S., J. S. Reis-Filho, A. Kennedy, M. James, M. J. O'Hare, R. Jeffery, R. Poulson and C. M. Isacke (2006). "Identification of transmembrane proteins as potential prognostic markers and therapeutic targets in breast cancer by a screen for signal sequence encoding transcripts." *J Pathol* **210**(4): 420-30.

Estrada, R., L. Wang, V. R. Jala, J. F. Lee, C. Y. Lin, R. D. Gray, B. Haribabu and M. J. Lee (2009). "Ligand-induced nuclear translocation of S1P(1) receptors mediates Cyr61 and CTGF transcription in endothelial cells." *Histochem Cell Biol* **131**(2): 239-49.

Farmer, S. G., S. J. Powell, D. E. Wilkins and A. Graham (1998). "Cloning, sequencing and functional expression of a guinea pig lung bradykinin B2 receptor." *Eur J Pharmacol* **346**(2-3): 291-8.

Favre, N., M. Camps, C. Arod, C. Chabert, C. Rommel and C. Pasquali (2008). "Chemokine receptor CCR2 undergoes transportin1-dependent nuclear translocation." *Proteomics* **8**(21): 4560-76.

Ferreira, M. J., N. Gyemant, A. M. Madureira, M. Tanaka, K. Koos, R. Didziapetris and J. Molnar (2005). "The effects of jatrophone derivatives on the reversion of MDR1- and MRP-mediated multidrug resistance in the MDA-MB-231 (HTB-26) cell line." *Anticancer Res* **25**(6B): 4173-8.

Figueroa, C. D., P. Ehrenfeld and K. D. Bhoola (2012). "Kinin receptors as targets for cancer therapy." *Expert Opin Ther Targets* **16**(3): 299-312.

Filteau, C. (1999). Développement, synthèse et caractérisation de nouveaux antagonistes du récepteur B1 des kinines. Pharmacologie. Sherbrooke, Qc, Canada, Université de Sherbrooke. **Mémoire de maîtrise.**

Fortier, A. (2007). Étude sur les effets anti-prolifératifs et cytotoxiques des antagonistes des kinines sur la lignée cancéreuse MB-MDA-231 implication potentielle des récepteurs B2 nucléaires. Pharmacologie. Sherbrooke, Université de Sherbrooke. **Mémoire de maîtrise.**

Fortier, A., V. Bovenzi, D. Fortin and F. Gobeil (2006). Étude de l'expression des récepteurs B1 et B2 des kinines chez les glioblastomes multiformes humains. 48e réunion annuelle, Club de recherche clinique du Québec.

Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin and H. B. Schiöth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256-72.

Fritz, H., F. Fiedler, T. Dietl, M. Warwas, E. Truscheit, H. Kolb, G. Mair and H. Tschesche (1977). On the relationship between pancreatic, submandibular and urinary kallikreins. Kininogenases: kallikrein. J. W. R. a. T. S. G.L. Haberland. (ed) New York: 15-28.

Fujita, M., T. Andoh, K. Ohashi, A. Akira, I. Saiki and Y. Kuraishi (2009). "Roles of kinin B1 and B2 receptors in skin cancer pain produced by orthotopic melanoma inoculation in mice." *Eur J Pain* **14**(6): 588-94.

Gabra, B. H., R. Couture and P. Sirois (2003). "Functional duality of kinin receptors in pathophysiology." *Med Sci (Paris)* **19**(11): 1101-10.

Galizzi, J. P., M. C. Bodinier, B. Chapelain, S. M. Ly, L. Coussy, S. Giraud, G. Neliat and T. Jean (1994). "Up-regulation of [3H]-des-Arg10-kallidin binding to the bradykinin B1 receptor by interleukin-1 beta in isolated smooth muscle cells: correlation with B1 agonist-induced PGI2 production." *Br J Pharmacol* **113**(2): 389-94.

Ge, X., J. Liu, Z. Shi, L. Jing, N. Yu, X. Zhang, Y. Jiao, Y. Wang and P. A. Li (2016). "Inhibition of MAPK signaling pathways enhances cell death induced by 5-Aminolevulinic acid-photodynamic therapy in skin squamous carcinoma cells." *Eur J Dermatol* **apr 1**(epub ahead of print).

Gera, L., J. M. Stewart, J. P. Fortin, G. Morissette and F. Marceau (2008). "Structural modification of the highly potent peptide bradykinin B1 receptor antagonist B9958." *Int Immunopharmacol* **8**(2): 289-92.

Gobeil, F., A. Fortier, T. Zhu, M. Bossolasco, M. Leduc, M. Grandbois, N. Heveker, G. Bkaily, S. Chemtob and D. Barbaz (2006a). "G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(3-4): 287-97.

Gobeil, F., Jr., S. G. Bernier, A. Vazquez-Tello, S. Brault, M. H. Beauchamp, C. Quiniou, A. M. Marrache, D. Checchin, F. Sennlaub, X. Hou, M. Nader, G. Bkaily, A. Ribeiro-da-Silva, E. J. Goetzl and S. Chemtob (2003a). "Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1." *J Biol Chem* **278**(40): 38875-83.

Gobeil, F., Jr., S. Charland, C. Filteau, S. I. Perron, W. Neugebauer and D. Regoli (1999). "Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities." *Hypertension* **33**(3): 823-9.

Gobeil, F., Jr., I. Dumont, A. M. Marrache, A. Vazquez-Tello, S. G. Bernier, D. Abran, X. Hou, M. H. Beauchamp, C. Quiniou, A. Bouayad, S. Choufani, M. Bhattacharya, S. Molotchnikoff, A. Ribeiro-Da-Silva, D. R. Varma, G. Bkaily and S. Chemtob (2002). "Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors." *Circ Res* **90**(6): 682-9.

Gobeil, F., Jr., P. Sirois and D. Regoli (2014). "Preclinical pharmacology, metabolic stability, pharmacokinetics and toxicology of the peptidic kinin B1 receptor antagonist R-954." *Peptides* **52**: 82-9.

Gobeil, F., Jr., A. Vazquez-Tello, A. M. Marrache, M. Bhattacharya, D. Checchin, G. Bkaily, P. Lachapelle, A. Ribeiro-Da-Silva and S. Chemtob (2003b). "Nuclear prostaglandin signaling system: biogenesis and actions via heptahelical receptors." *Can J Physiol Pharmacol* **81**(2): 196-204.

Gobeil, F., Jr., T. Zhu, S. Brault, A. Geha, A. Vazquez-Tello, A. Fortier, D. Barbaz, D. Checchin, X. Hou, M. Nader, G. Bkaily, J. P. Gratton, N. Heveker, A. Ribeiro-da-Silva, K. Peri, H. Bard, A. Chorvatova, P. D'Orleans-Juste, E. J. Goetzl and S. Chemtob (2006b). "Nitric oxide signaling via nuclearized endothelial nitric-oxide synthase modulates expression of the immediate early genes iNOS and mPGES-1." *J Biol Chem* **281**(23): 16058-67.

Gobeil, F., W. Neugebauer, C. Filteau, D. Jukic, S. N. Allogho, L. H. Pheng, X. K. Nguyen-Le, D. Blouin and D. Regoli (1996a). "Structure-activity studies of B1 receptor-related peptides. Antagonists." *Hypertension* **28**(5): 833-9.

Gobeil, F., W. Neugebauer, X. K. Nguyen-Le, S. Nea Allogho, L. H. Pheng, D. Blouin, E. T. Whalley and D. Regoli (1997). "Pharmacological profiles of the human and rabbit B1 receptors." *Can J Physiol Pharmacol* **75**(6): 591-5.

Gobeil, F., L. H. Pheng, I. Badini, X. K. Nguyen-Le, A. Pizard, A. Rizzi, D. Blouin and D. Regoli (1996b). "Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein." *Br J Pharmacol* **118**(2): 289-94.

Gohla, A., S. Offermanns, T. M. Wilkie and G. Schultz (1999). "Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation." *J Biol Chem* **274**(25): 17901-7.

Goldstein, D. M. and T. Gabriel (2005). "Pathway to the clinic: inhibition of P38 MAP kinase. A review of ten chemotypes selected for development." *Curr Top Med Chem* **5**(10): 1017-29.

Goldstein, R. H. and M. Wall (1984). "Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg9-bradykinin." *J Biol Chem* **259**(14): 9263-8.

Golias, C., A. Charalabopoulos, D. Stagikas, K. Charalabopoulos and A. Batistatou (2007). "The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin." *Hippokratia* **11**(3): 124-8.

Gomis, A., S. Meini, A. Miralles, C. Valenti, S. Giuliani, C. Belmonte and C. A. Maggi (2013). "Blockade of nociceptive sensory afferent activity of the rat knee joint by the bradykinin B2 receptor antagonist fasinabant." *Osteoarthritis Cartilage* **21**(9): 1346-54.

Gougat, J., B. Ferrari, L. Sarran, C. Planchenault, M. Poncelet, J. Maruani, R. Alonso, A. Cudennec, T. Croci, F. Guagnini, K. Urban-Szabo, J. P. Martinolle, P. Soubrie, O. Finance and G. Le Fur (2004). "SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-imethylpiperidiny]methyl]phenyl)-N-isopropyl -N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization." *J Pharmacol Exp Ther* **309**(2): 661-9.

Graness, A., A. Adomeit, R. Heinze, R. Wetzker and C. Liebmann (1998). "A novel mitogenic signaling pathway of bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a Gq/11 protein, phosphatidylinositol 3-kinase beta, and protein kinase Cepsilon." *J Biol Chem* **273**(48): 32016-22.

Gras-Masse, H. (2003). "Lipid vector for the delivery of peptides towards intracellular pharmacological targets." *J Mol Recognit* **16**(5): 234-9.

Greco, S., M. G. Elia, A. Muscella, S. Romano, C. Storelli and S. Marsigliante (2005). "Bradykinin stimulates cell proliferation through an extracellular-regulated kinase 1 and 2-dependent mechanism in breast cancer cells in primary culture." *J Endocrinol* **186**(2): 291-301.

Greco, S., A. Muscella, M. G. Elia, S. Romano, C. Storelli and S. Marsigliante (2004). "Mitogenic signalling by B2 bradykinin receptor in epithelial breast cells." *J Cell Physiol* **201**(1): 84-96.

Green, T. M., M. L. Alpaugh, S. H. Barsky, G. Rappa and A. Lorico (2015). "Breast Cancer-Derived Extracellular Vesicles: Characterization and Contribution to the Metastatic Phenotype." *Biomed Res Int* **2015**: 634865.

Guevara-Lora, I., B. Blonska, A. Faussner and A. Kozik (2013). "Kinin-generating cellular model obtained from human glioblastoma cell line U-373." *Acta Biochim Pol* **60**(3): 299-305.

Gupta, B., T. S. Levchenko and V. P. Torchilin (2005). "Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides." *Adv Drug Deliv Rev* **57**(4): 637-51.

Gutkind, J. S. (1998). "The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades." *J Biol Chem* **273**(4): 1839-42.

Hall, J. M. (1997). The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. The kinin system. S. G. F. (Ed.). New York, Academic Press: 9-43.

Han, J., S. Y. Bae, S. J. Oh, J. Lee, J. H. Lee, H. C. Lee, S. K. Lee, W. H. Kil, S. W. Kim, S. J. Nam, S. Kim and J. E. Lee (2014). "Zerumbone suppresses IL-1beta-induced cell migration and invasion by inhibiting IL-8 and MMP-3 expression in human triple-negative breast cancer cells." *Phytother Res* **28**(11): 1654-60.

Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs and R. J. Ulevitch (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." *Science* **265**(5173): 808-11.

Hanyaloglu, A. C., E. McCullagh and M. von Zastrow (2005). "Essential role of Hrs in a recycling mechanism mediating functional resensitization of cell signaling." *Embo J* **24**(13): 2265-83.

Heitsch, H. (2003). "The therapeutic potential of bradykinin B2 receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease." *Expert Opin Investig Drugs* **12**(5): 759-70.

Hermawan, A., E. Wagner and A. Roidl (2016). "Consecutive salinomycin treatment reduces doxorubicin resistance of breast tumor cells by diminishing drug efflux pump expression and activity." *Oncol Rep* **35**(3): 1732-40.

Hock, F. J., K. Wirth, U. Albus, W. Linz, H. J. Gerhards, G. Wiemer, S. Henke, G. Breipohl, W. Konig, J. Knolle and et al. (1991). "Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies." *Br J Pharmacol* **102**(3): 769-73.

Hock, J., R. Vogel, R. P. Linke and W. Muller-Esterl (1990). "High molecular weight kininogen-binding site of prekallikrein probed by monoclonal antibodies." *J Biol Chem* **265**(20): 12005-11.

Holleman, J. and A. Marchese (2014). "The ubiquitin ligase deltex-3l regulates endosomal sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4." *Mol Biol Cell* **25**(12): 1892-904.

Hossain, S., De La Cruz-Morcillo, M-A., R. Sanchez-Prieto and G Almazan (2012). "Mitogen-activated protein kinase p38 regulates Krox-20 to direct Schwann cell differentiation and peripheral myelination." *Glia* **60**:1130-1144.

Huang, C. Y., Y. H. Chou, N. T. Hsieh, H. H. Chen and M. F. Lee (2012). "MED28 regulates MEK1-dependent cellular migration in human breast cancer cells." *J Cell Physiol* **227**(12): 3820-7.

Huang, Y., N. Benaich, C. Tape, H. F. Kwok and G. Murphy (2014). "Targeting the sheddase activity of ADAM17 by an anti-ADAM17 antibody D1(A12) inhibits head and neck squamous cell carcinoma cell proliferation and motility via blockage of bradykinin induced HERs transactivation." *Int J Biol Sci* **10**(7): 702-14.

Inamura, N., M. Asano, H. Kayakiri, C. Hatori, T. Oku and K. Nakahara (1997). "Characterization of FR173657, a novel nonpeptide B2 antagonist: in vitro and in vivo studies." *Can J Physiol Pharmacol* **75**(6): 622-8.

Inamura, T. and K. L. Black (1994). "Bradykinin selectively opens blood-tumor barrier in experimental brain tumors." *J Cereb Blood Flow Metab* **14**(5): 862-70.

Ip, Y. T. and R. J. Davis (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." *Curr Opin Cell Biol* **10**(2): 205-19.

Ishihara, K., M. Kamata, I. Hayashi, S. Yamashina and M. Majima (2002). "Roles of bradykinin in vascular permeability and angiogenesis in solid tumor." *Int Immunopharmacol* **2**(4): 499-509.

Jalink, K. and W. H. Moolenaar (2010). "G protein-coupled receptors: the inside story." *Bioessays* **32**(1): 13-6.

Jeffrey, P. D., A. A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massague and N. P. Pavletich (1995). "Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex." *Nature* **376**(6538): 313-20.

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin* **61**(2): 69-90.

Jensen, M. M., J. T. Jorgensen, T. Binderup and A. Kjaer (2008). "Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper." *BMC Med Imaging* **8**: 16.

Jiang, X. and A. Sorkin (2002). "Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells." *Mol Biol Cell* **13**(5): 1522-35.

Jones, S. W., R. Christison, K. Bundell, C. J. Voyce, S. M. Brockbank, P. Newham and M. A. Lindsay (2005). "Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery." *Br J Pharmacol* **145**(8): 1093-102.

Jong, Y. J., V. Kumar and K. L. O'Malley (2009). "Intracellular metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) activates signaling cascades distinct from cell surface counterparts." *J Biol Chem* **284**(51): 35827-38.

Jong, Y. J., I. Sergin, C. A. Purgert and K. L. O'Malley (2014). "Location-dependent signaling of the group 1 metabotropic glutamate receptor mGlu5." *Mol Pharmacol* **86**(6): 774-85.

Joyal, J. S., V. K. Bhosle and S. Chemtob (2015). "Subcellular G-protein coupled receptor signaling hints at greater therapeutic selectivity." *Expert Opin Ther Targets* **19**(6): 717-21.

Joyal, J. S., S. Nim, T. Zhu, N. Sitaras, J. C. Rivera, Z. Shao, P. Sapiha, D. Hamel, M. Sanchez, K. Zaniolo, M. St-Louis, J. Ouellette, M. Montoya-Zavala, A. Zabeida, E. Picard, P. Hardy, V. Bhosle, D. R. Varma, F. Gobeil, Jr., C. Beausejour, C. Boileau, W. Klein, M. Hollenberg, A. Ribeiro-da-Silva, G. Andelfinger and S. Chemtob (2014). "Subcellular localization of coagulation factor II receptor-like 1 in neurons governs angiogenesis." *Nat Med* **20**(10): 1165-73.

Katritch, V., V. Cherezov and R. C. Stevens (2013). "Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**: 531-56.

Khoury, E., S. Clement and S. A. Laporte (2014a). "Allosteric and biased g protein-coupled receptor signaling regulation: potentials for new therapeutics." *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**: 68.

Khoury, E., L. Nikolajev, M. Simaan, Y. Namkung and S. A. Laporte (2014b). "Differential regulation of endosomal GPCR/beta-arrestin complexes and trafficking by MAPK." *J Biol Chem* **289**(34): 23302-17.

Kiefer, P., P. Acland, D. Pappin, G. Peters and C. Dickson (1994). "Competition between nuclear localization and secretory signals determines the subcellular fate of a single CUG-initiated form of FGF3." *Embo J* **13**(17): 4126-36.

Kim, J. H., D. Jain, O. Tliba, B. Yang, W. F. Jester, Jr., R. A. Panettieri, Jr., Y. Amrani and E. Pure (2005). "TGF-beta potentiates airway smooth muscle responsiveness to bradykinin." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**(4): L511-20.

Kinsey, C. G., G. Bussolati, M. Bosco, T. Kimura, M. C. Pizzorno, M. I. Chernin, P. Cassoni and J. F. Novak (2007). "Constitutive and ligand-induced nuclear localization of oxytocin receptor." *J Cell Mol Med* **11**(1): 96-110.

Kramarenko, II, M. A. Bunni, J. R. Raymond and M. N. Garnovskaya (2010). "Bradykinin B2 receptor interacts with integrin alpha5beta1 to transactivate epidermal growth factor receptor in kidney cells." *Mol Pharmacol* **78**(1): 126-34.

Kuhr, F. K., Y. Zhang, V. Brovkovich and R. A. Skidgel (2010). "Beta-arrestin 2 is required for B1 receptor-dependent post-translational activation of inducible nitric oxide synthase." *Faseb J* **24**(7): 2475-83.

Le Corvoisier, P., M.-E. Lopes, E. Aptecar, L. Hittinger and J. Su (2000). "Bradykinines: facteurs protecteurs cardiovasculaires." *Sang Thromboses Vaisseaux* **12**(3): 157-163.

Lee, D. K., A. J. Lanca, R. Cheng, T. Nguyen, X. D. Ji, F. Gobeil, Jr., S. Chemtob, S. R. George and B. F. O'Dowd (2004). "Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors." *J Biol Chem* **279**(9): 7901-8.

Lee, T. H., S. Seng, M. Sekine, C. Hinton, Y. Fu, H. K. Avraham and S. Avraham (2007). "Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1." *PLoS Med* **4**(6): e186.

Leeb-Lundberg, L. M., F. Marceau, W. Muller-Esterl, D. J. Pettibone and B. L. Zuraw (2005). "International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences." *Pharmacol Rev* **57**(1): 27-77.

Lehmann, B. D., J. A. Bauer, X. Chen, M. E. Sanders, A. B. Chakravarthy, Y. Shyr and J. A. Pietenpol (2011). "Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies." *J Clin Invest* **121**(7): 2750-67.

Lessard, A., M. Savard, F. Gobeil, Jr., J. P. Pierce and V. M. Pickel (2009). "The neurokinin-3 (NK3) and the neurokinin-1 (NK1) receptors are differentially targeted to mesocortical and mesolimbic projection neurons and to neuronal nuclei in the rat ventral tegmental area." *Synapse* **63**(6): 484-501.

Li, H. S., D. B. Stolz and G. Romero (2005). "Characterization of endocytic vesicles using magnetic microbeads coated with signalling ligands." *Traffic* **6**(4): 324-34.

Liao, J. J., M. C. Huang, M. Graler, Y. Huang, H. Qiu and E. J. Goetzl (2007). "Distinctive T cell-suppressive signals from nuclearized type 1 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptors." *J Biol Chem* **282**(3): 1964-72.

Liebmann, C. (2001). "Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways." *Biol Chem* **382**(1): 49-55.

Liebmann, C. and F. D. Bohmer (2000). "Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling." *Curr Med Chem* **7**(9): 911-43.

Liontos, M., Velimezi, G., Pateras, I.S., Angelopoulou, R., Papavassiliou., A.G., J. Bartek and V.G. Gorgoulis (2010). "The roles of p27kip1 and DNA damage signalling in the chemotherapy-induced delayed cell cycle checkpoint." *J. Cell. Mol. Med.* **14**(9): 2264-2267.

Liston, P., N. Roy, K. Tamai, C. Lefebvre, S. Baird, G. Cherton-Horvat, R. Farahani, M. McLean, J. E. Ikeda, A. MacKenzie and R. G. Korneluk (1996). "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes." *Nature* **379**(6563): 349-53.

Ljunggren, O. and U. H. Lerner (1990). "Evidence for BK1 bradykinin-receptor-mediated prostaglandin formation in osteoblasts and subsequent enhancement of bone resorption." *Br J Pharmacol* **101**(2): 382-6.

Lo, H. W., W. Xia, Y. Wei, M. Ali-Seyed, S. F. Huang and M. C. Hung (2005). "Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer." *Cancer Res* **65**(1): 338-48.

Lu, D., H. Yang, G. Shaw and M. Raizada (1998). "Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons." *Endocrinology* **139**: 365-375.

Lu, D. Y., Y. M. Leung, S. M. Huang and K. L. Wong (2010). "Bradykinin-induced cell migration and COX-2 production mediated by the bradykinin B1 receptor in glioma cells." *J Cell Biochem* **110**(1): 141-50.

Madani, F., S. Lindberg, U. Langel, S. Futaki and A. Graslund (2011). "Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides." *J Biophys* **2011**: 414729.

Mae, M., Myrberg, H., El-Andaloussi, S., Langel, U. (2009). "Design of a tumour homing cell-penetrating peptide for drug delivery." *Int. J. pept. Res. Ther.* **15**: 11-15.

Manolis, A. J., M. E. Marketou, I. Gavras and H. Gavras (2010). "Cardioprotective properties of bradykinin: role of the B(2) receptor." *Hypertens Res* **33**(8): 772-7.

Marceau, F. (1995). "Kinin B1 receptors: a review." *Immunopharmacology* **30**(1): 1-26.

Marceau, F., J. Barabe, S. St-Pierre and D. Regoli (1980). "Kinin receptors in experimental inflammation." *Can J Physiol Pharmacol* **58**(5): 536-42.

Marceau, F., J. F. Hess and D. R. Bachvarov (1998). "The B1 receptors for kinins." *Pharmacol Rev* **50**(3): 357-86.

Marceau, F. and D. Regoli (2004). "Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives." *Nat Rev Drug Discov* **3**(10): 845-52.

Marcondes, S. and E. Antunes (2005). "The plasma and tissue kininogen-kallikrein-kinin system: role in the cardiovascular system." *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* **3**(1): 33-44.

Margolis, J. (1963). "The interrelationship of coagulation of plasma and release of peptides." *Ann N Y Acad Sci* **104**: 133-45.

Marrache, A. M., F. Gobeil, Jr., S. G. Bernier, J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, S. Choufani, G. Bkaily, A. Bourdeau, M. G. Sirois, A. Vazquez-Tello, L. Fan, J. S. Joyal, J. G. Filep, D. R. Varma, A. Ribeiro-Da-Silva and S. Chemtob (2002). "Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor." *J Immunol* **169**(11): 6474-81.

Massfelder, T., P. Dann, T. L. Wu, R. Vasavada, J. J. Helwig and A. F. Stewart (1997). "Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13630-5.

McLean, P. G., M. Perretti and A. Ahluwalia (2000). "Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function." *Cardiovasc Res* **48**(2): 194-210.

Menke, J. G., J. A. Borkowski, K. K. Bierilo, T. MacNeil, A. W. Derrick, K. A. Schneck, R. W. Ransom, C. D. Strader, D. L. Linemeyer and J. F. Hess (1994). "Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor." *J Biol Chem* **269**(34): 21583-6.

Millar, R. P. and C. L. Newton (2010). "The year in G protein-coupled receptor research." *Mol Endocrinol* **24**(1): 261-74.

Milletti, F. (2011). "Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape." *Drug Discov Today* **17**(15-16): 850-60.

Molina, L., C. E. Matus, A. Astroza, F. Pavicic, E. Tapia, C. Toledo, J. A. Perez, F. Nualart, C. B. Gonzalez, R. A. Burgos, C. D. Figueroa, P. Ehrenfeld and M. T. Poblete (2009). "Stimulation of the bradykinin B(1) receptor induces the proliferation of estrogen-sensitive breast cancer cells and activates the ERK1/2 signaling pathway." *Breast Cancer Res Treat* **118**(3): 499-510.

Montana, V. and H. Sontheimer (2011). "Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors." *J Neurosci* **31**(13): 4858-67.

Moodley, R., C. Snyman, B. Odhav and K. D. Bhoola (2005). "Visualisation of transforming growth factor-beta 1, tissue kallikrein, and kinin and transforming growth factor-beta receptors on human clear-cell renal carcinoma cells." *Biol Chem* **386**(4): 375-82.

Moore, C. A., S. K. Milano and J. L. Benovic (2007). "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins." *Annu Rev Physiol* **69**: 451-82.

Moreau, M. E., N. Garbacki, G. Molinaro, N. J. Brown, F. Marceau and A. Adam (2005). "The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets." *J Pharmacol Sci* **99**(1): 6-38.

Morinelli, T. A., J. R. Raymond, A. Baldys, Q. Yang, M. H. Lee, L. Luttrell and M. E. Ullian (2007). "Identification of a putative nuclear localization sequence within ANG II AT(1A) receptor associated with nuclear activation." *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(4): C1398-408.

Morissette, G., S. Houle, L. Gera, J. M. Stewart and F. Marceau (2007). "Antagonist, partial agonist and antiproliferative actions of B-9870 (CU201) as a function of the expression and density of the bradykinin B1 and B2 receptors." *Br J Pharmacol* **150**(3): 369-79.

Morissette, G., T. Sabourin, A. Adam and F. Marceau (2006). "Inhibition of human and rabbit arterial smooth muscle cell migration mediated by the kinin B1 receptor: role of receptor density and released mediators." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(11): 1107-19.

Muller-Esterl, W. (1992). Kininogens, kinins and kinships. The kallikrein-kinin system in health and diseases. Munich, H. Fritz, I. Schmidt, G. Dietze: 289-300.

Nagler, D. K., S. Kraus, J. Feierler, R. Mentele, F. Lottspeich, M. Jochum and A. Faussner (2009). "A cysteine-type carboxypeptidase, cathepsin X, generates peptide receptor agonists." *Int Immunopharmacol* **10**(1): 134-9.

Naidu, N., J. H. Botha and S. Naidoo (2014). "B1 but not B2 bradykinin receptor agonists promote DU145 prostate cancer cell proliferation and migration." *Afr Health Sci* **14**(3): 657-62.

Nakayama, K. I. and K. Nakayama (2006). "Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(5): 369-81.

Naraba, H., A. Ueno, Y. Kosugi, M. Yoshimura, M. Murakami, I. Kudo and S. Oh-ishi (1998). "Agonist stimulation of B1 and B2 kinin receptors causes activation of the MAP kinase signaling pathway, resulting in the translocation of AP-1 in HEK 293 cells." *FEBS Lett* **435**(1): 96-100.

Neugebauer, W., P. A. Blais, S. Halle, C. Filteau, D. Regoli and F. Gobeil, Jr. (2002). "Kinin B1 receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties." *Can J Physiol Pharmacol* **80**(4): 287-92.

Neugebauer, W., J. Côté, A. Fortier, G. Bkaily, L. Avedanian, D. Jacques and F. Gobeil (2005). "Steroid-peptide conjugates." 19<sup>th</sup> American Peptide Symposium. *Peptide Sciences* 80(4): 526.

Neugebauer, W., Savard, M., Elkara, S., Sirois, P. and Gobeil F. (2008). "Analogues of the kinin B1 receptor antagonist R-954 bearing N-terminal lipid moieties." 30th European peptide Symposium, Helsinki, Finland, edit. by H. Lankinen, p546-547.

Nguyen, T.T.M. (2013). "Exploration of functional nuclear urotensin II receptors: biochemical and pharmacological characteristics, and specific tissue distribution." Biologie. Montréal, INRS et UQAM. Thèse de doctorat.

Nicoletti, N. F., T. C. Erig, R. F. Zanin, T. C. Pereira, M. R. Bogo, M. M. Campos and F. B. Morrone (2014). "Mechanisms involved in kinin-induced glioma cells proliferation: the role of ERK1/2 and PI3K/Akt pathways." *J Neurooncol* **120**(2): 235-44.

Nielsen, C. K., J. I. Campbell, J. F. Ohd, M. Morgelin, K. Riesbeck, G. Landberg and A. Sjolander (2005). "A novel localization of the G-protein-coupled CysLT1 receptor in the nucleus of colorectal adenocarcinoma cells." *Cancer Res* **65**(3): 732-42.

Niewiarowski, S., E. Bankowski and I. Rogowicka (1965). "Studies on the adsorption and activation of the Hageman factor (factor XII) by collagen and elastin." *Thromb Diath Haemorrh* **14**(3-4): 387-400.

Nishizuka, Y. (1992). "Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C." *Science* **258**(5082): 607-14.

Olejek, A., U. Mazurek, D. Kusmierz, A. Michalska and T. Wilczok (2002). "[Correlation between the expression of mRNA of histones H2B and H4 and mRNA of kinin receptors B1 and B2 assessed by QRT-PCR in vulvar cancer]." *Ginekol Pol* **73**(11): 897-903.

Oltmanns, U., R. Issa, M. B. Sukkar, M. John and K. F. Chung (2003). "Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells." *Br J Pharmacol* **139**(6): 1228-34.

Padmanabhan, S., A. G. Myers and B. M. Prasad (2009). "Constitutively active GPR6 is located in the intracellular compartments." *FEBS Lett* **583**(1): 107-12.

Paegelow, I., S. Trzeczak, S. Bockmann and G. Vietinghoff (2002). "Migratory responses of polymorphonuclear leukocytes to kinin peptides." *Pharmacology* **66**(3): 153-61.

Palma, G., G. Frasci, A. Chirico, E. Esposito, C. Siani, C. Saturnino, C. Arra, G. Ciliberto, A. Giordano and M. D'Aiuto (2015). "Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments." *Oncotarget* **6**(29): 26560-74.

Pan, Z. K., B. L. Zuraw, C. C. Lung, E. R. Prossnitz, D. D. Browning and R. D. Ye (1996). "Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1beta gene expression in cultured human fibroblasts." *J Clin Invest* **98**(9): 2042-9.

Papapetropoulos, A., G. Garcia-Cardena, J. A. Madri and W. C. Sessa (1997). "Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells." *J Clin Invest* **100**(12): 3131-9.

Paplomata, E. and R. O'Regan (2014). "The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers." *Ther Adv Med Oncol* **6**(4): 154-66.

Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-83.

Phagoo, S. B., S. Poole and L. M. Leeb-Lundberg (1999). "Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts." *Mol Pharmacol* **56**(2): 325-33.

Pickard, B. W., A. B. Hodsman, L. J. Fraher and P. H. Watson (2006). "Type 1 parathyroid hormone receptor (PTH1R) nuclear trafficking: association of PTH1R with importin alpha1 and beta." *Endocrinology* **147**(7): 3326-32.

Pillai, M.S. and S.S.K. Shivakumar (2011). "p38 MAPK regulates G1-S transition in hypoxic cardiac fibroblasts." *Int. J. Cell. Biochem. Cell. Biol.* **43**: 919-927.

Plendl, J., C. Snyman, S. Naidoo, S. Sawant, R. Mahabeer and K. D. Bhoola (2000). "Expression of tissue kallikrein and kinin receptors in angiogenic microvascular endothelial cells." *Biol Chem* **381**(11): 1103-15.

Potier, L., L. Waeckel, M. P. Vincent, C. Chollet, F. Gobeil, Jr., M. Marre, P. Bruneval, C. Richer, R. Roussel, F. Alhenc-Gelas and N. Bouby (2013). "Selective kinin receptor agonists as cardioprotective agents in myocardial ischemia and diabetes." *J Pharmacol Exp Ther* **346**(1): 23-30.

Prado, G. N., L. Taylor, X. Zhou, D. Ricupero, D. F. Mierke and P. Polgar (2002). "Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors." *J Cell Physiol* **193**(3): 275-86.

Raidoo, D. M., S. Sawant, R. Mahabeer and K. D. Bhoola (1999). "Kinin receptors are expressed in human astrocytic tumour cells." *Immunopharmacology* **43**(2-3): 255-63.

Rangachari, P. K., M. Berezin and T. Prior (1993). "Effects of bradykinin on the canine proximal colon." *Regul Pept* **46**(3): 511-22.

Re, M., M. Pampillo, M. Savard, C. Dubuc, C. A. McArdle, R. P. Millar, P. M. Conn, F. Gobeil, Jr., M. Bhattacharya and A. V. Babwah (2010). "The human gonadotropin releasing hormone type I receptor is a functional intracellular GPCR expressed on the nuclear membrane." *PLoS One* **5**(7): e11489.

Re, R. and S. E. Bryan (1984). "Functional intracellular renin-angiotensin systems may exist in multiple tissues." *Clin Exp Hypertens A* **6**(10-11): 1739-42.

Re, R. N. (2002). "Toward a theory of intracrine hormone action." *Regul Pept* **106**(1-3): 1-6.

Re, R. N. (2011). "Lysosomal action of intracrine angiotensin II. Focus on "Intracellular angiotensin II activates rat myometrium"." *Am J Physiol Cell Physiol* **301**(3): C553-4.

Re, R. N. and J. L. Cook (2006). "The intracrine hypothesis: an update." *Regul Pept* **133**(1-3): 1-9.

Re, R. N. and J. L. Cook (2008). "The basis of an intracrine pharmacology." *J Clin Pharmacol* **48**(3): 344-50.

Re, R. N. and J. L. Cook (2009). "Senescence, apoptosis, and stem cell biology: the rationale for an expanded view of intracrine action." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(3): H893-901.

Re, R. N. and J. L. Cook (2011). "Noncanonical intracrine action." *J Am Soc Hypertens* **5**(6): 435-48.

Re, R. N. and J. L. Cook (2015). "Studies of intracellular angiotensin II." *Methods Mol Biol* **1234**: 1-8.

Reddigari, S. and A. P. Kaplan (1989). "Quantification of human high molecular weight kininogen by immunoblotting with a monoclonal anti-light chain antibody." *J Immunol Methods* **119**(1): 19-25.

Regoli, D. and J. Barabe (1980). "Pharmacology of bradykinin and related kinins." *Pharmacol Rev* **32**(1): 1-46.

Regoli, D., Barabé J. and WK Park (1977). "Receptors for bradykinin in rabbit aortae." *Can J Physiol Pharmacol* **55**(4): 855-67.

Regoli, D. and F. Gobeil (2016). "Kinins and Peptide Receptors." *Biol Chem*; **397**(4): 297-304.

Regoli, D., D. Jukic, F. Gobeil and N. E. Rhaleb (1993). "Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis." *Can J Physiol Pharmacol* **71**(8): 556-67.

Regoli, D., S. Nsa Allogho, A. Rizzi and F. J. Gobeil (1998). "Bradykinin receptors and their antagonists." *Eur J Pharmacol* **348**(1): 1-10.

Regoli, D., G. E. Plante and F. Gobeil, Jr. (2012). "Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases." *Pharmacol Ther* **135**(1): 94-111.

Reid, H. M. and B. T. Kinsella (2007). "Palmitoylation of the TPbeta isoform of the human thromboxane A2 receptor. Modulation of G protein: effector coupling and modes of receptor internalization." *Cell Signal* **19**(5): 1056-70.

Reis, M. L., F. Alhenc-Gelas, M. Alhenc-Gelas, J. Allegrini, D. Kerbiriou-Nabias, P. Corvol and J. Menard (1985). "Rat high-molecular-weight kininogen: purification, production of antibodies and demonstration of lack of immunoreactive kininogen in a strain of brown Norway rats." *Biochim Biophys Acta* **831**(1): 106-13.

Rhaleb, N. E., G. Drapeau, S. Dion, D. Jukic, N. Rouissi and D. Regoli (1990). "Structure-activity studies on bradykinin and related peptides: agonists." *Br J Pharmacol* **99**(3): 445-8.

Rhaleb, N. E., N. Rouissi, D. Jukic, D. Regoli, S. Henke, G. Breipohl and J. Knolle (1992). "Pharmacological characterization of a new highly potent B2 receptor antagonist (HOE 140: D-Arg-[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Qic8]bradykinin)." *Eur J Pharmacol* **210**(2): 115-20.

Rizzi, A., G. Calo, S. Amadesi and D. Regoli (1997). "Kinin B1 and B2 receptors in pig vessels: characterization of two monoreceptor systems." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**(5): 662-70.

Robben, J. H., M. L. Kortenoeven, M. Sze, C. Yae, G. Milligan, V. M. Oorschot, J. Klumperman, N. V. Knoers and P. M. Deen (2009). "Intracellular activation of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus by nonpeptide agonists." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(29): 12195-200.

Rovati, G. E., V. Capra and R. R. Neubig (2007). "The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state." *Mol Pharmacol* **71**(4): 959-64.

Sadovska, L., J. Eglitis and A. Line (2015). "Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Targets in Breast Cancer." *Anticancer Res* **35**(12): 6379-90.

Sanovich, E., R. T. Bartus, P. M. Friden, R. L. Dean, H. Q. Le and M. W. Brightman (1995). "Pathway across blood-brain barrier opened by the bradykinin agonist, RMP-7." *Brain Res* **705**(1-2): 125-35.

Savard, M., D. Barbaz, S. Belanger, W. Muller-Esterl, G. Bkaily, P. D'Orleans-Juste, J. Cote, V. Bovenzi and F. Gobeil, Jr. (2008). "Expression of endogenous nuclear bradykinin B2 receptors mediating signaling in immediate early gene activation." *J Cell Physiol* **216**(1): 234-44.

Savard, M., J. Côté, L. Tremblay, W. Neugebauer, D. Regoli, S. Gariépy, N. Hébert and F. Gobeil (2016). "Safety and pharmacokinetics of a kinin B1 receptor peptide agonist produced with different counter-ions." *Biol Chem* **397**(4): 365-372.

Savard, M., J. Labonte, C. Dubuc, W. Neugebauer, P. D'Orleans-Juste and F. Gobeil, Jr. (2013). "Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin B2 receptor agonist." *Biol Chem* **394**(3): 353-60.

Schanstra, J. P., E. Bataille, M. E. Marin Castano, Y. Barascud, C. Hirtz, J. B. Pesquero, C. Pecher, F. Gauthier, J. P. Girolami and J. L. Bascands (1998). "The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts." *J Clin Invest* **101**(10): 2080-91.

Schroeder, J. A., Bitler, B.G. (2010). "Anti-cancer therapies that utilize cell penetrating peptides." *Recent Pat. Anticancer drug Discov.* **5**: 1-10.

Seifert, S. and H. Sontheimer (2014). "Bradykinin enhances invasion of malignant glioma into the brain parenchyma by inducing cells to undergo amoeboid migration." *J Physiol* **592**(Pt 22): 5109-27.

Senger, D. R., C. A. Perruzzi, J. Feder and H. F. Dvorak (1986). "A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines." *Cancer Res* **46**(11): 5629-32.

Shapiro, M. J. and S. R. Coughlin (1998). "Separate signals for agonist-independent and agonist-triggered trafficking of protease-activated receptor 1." *J Biol Chem* **273**(44): 29009-14.

Sharma, J. and G. Al-Sherif (2011). "The kinin system: present and future pharmacological targets." *Am. J. Biomed. Sci.* **3**(2): 156-169.

Shibuta, K., M. Mori, K. Shimoda, H. Inoue, P. Mitra and G. F. Barnard (2002). "Regional expression of CXCL12/CXCR4 in liver and hepatocellular carcinoma and cell-cycle variation during in vitro differentiation." *Jpn J Cancer Res* **93**(7): 789-97.

Simaan, M., S. Bedard-Goulet, D. Fessart, J. P. Gratton and S. A. Laporte (2005). "Dissociation of beta-arrestin from internalized bradykinin B2 receptor is necessary for receptor recycling and resensitization." *Cell Signal* **17**(9): 1074-83.

Sorkin, A. and M. Von Zastrow (2002). "Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(8): 600-14.

Spano, J. P., F. Andre, L. Morat, L. Sabatier, B. Besse, C. Combadiere, P. Deterre, A. Martin, J. Azorin, D. Valeyre, D. Khayat, T. Le Chevalier and J. C. Soria (2004). "Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome." *Ann Oncol* **15**(4): 613-7.

Speetjens, F. M., G. J. Liefers, C. J. Korbee, W. E. Mesker, C. J. van de Velde, R. L. van Vlierberghe, H. Morreau, R. A. Tollenaar and P. J. Kuppen (2009). "Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients." *Cancer Microenviron* **2**(1): 1-7.

Stephens, D. J. and R. Pepperkok (2001). "The many ways to cross the plasma membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4295-8.

Stewart, J. M. (2004). "Bradykinin antagonists: discovery and development." *Peptides* **25**(3): 527-32.

Stewart, J. M., D. C. Chan, V. Simkeviciene, P. A. Bunn, Jr., B. Helfrich, E. J. York, L. Taraseviciene-Stewart, D. Bironaite and L. Gera (2002a). "Bradykinin antagonists as new drugs for prostate cancer." *Int Immunopharmacol* **2**(13-14): 1781-6.

Stewart, J. M., L. Gera, D. C. Chan, P. A. Bunn, Jr., E. J. York, V. Simkeviciene and B. Helfrich (2002b). "Bradykinin-related compounds as new drugs for cancer and inflammation." *Can J Physiol Pharmacol* **80**(4): 275-80.

Stewart, J. M., L. Gera, D. C. Chan, E. T. Whalley, W. L. Hanson and J. S. Zuzack (1997). "Potent, long-acting bradykinin antagonists for a wide range of applications." *Can J Physiol Pharmacol* **75**(6): 719-24.

Stewart, J. M., L. Gera, W. Hanson, J. S. Zuzack, M. Burkard, R. McCullough and E. T. Whalley (1996). "A new generation of bradykinin antagonists." *Immunopharmacology* **33**(1-3): 51-60.

Stewart, J.M. and R.J. Vavrek (1991). "Chemistry of peptide B2 bradykinin antagonists". Bradykinin antagonists. Burch RM, Marcel Dekker Inc (ed), NY. pp. 51-96.

Stuardo, M., C. B. Gonzalez, F. Nualart, M. Boric, J. Corthorn, K. D. Bhoola and C. D. Figueroa (2004). "Stimulated human neutrophils form biologically active kinin peptides from high and low molecular weight kininogens." *J Leukoc Biol* **75**(4): 631-40.

Swat, A., Dolado, I., J.M. Rojas and A.R. Nebreda (2009). "Cell density-dependant inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase via Sprouty2 downregulation." *Mol. Cell. Biol.* **29**(12): 3332-3343.

Tadevosyan, A., M. Letourneau, B. Folch, N. Doucet, L. R. Villeneuve, A. M. Mamarbachi, D. Petrin, T. E. Hebert, A. Fournier, D. Chatenet, B. G. Allen and S. Nattel (2015). "Photoreleasable ligands to study intracrine angiotensin II signalling." *J Physiol* **593**(3): 521-39.

Tadevosyan, A., G. Vaniotis, B. G. Allen, T. E. Hebert and S. Nattel (2012). "G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function." *J Physiol* **590**(Pt 6): 1313-30.

Takano, M., A. Kanoh, K. Amako, M. Otani, K. Sano, M. Kanazawa-Hamada and S. Matsuyama (2014). "Nuclear localization of bradykinin B(2) receptors reflects binding to the nuclear envelope protein lamin C." *Eur J Pharmacol* **723**: 507-14.

Taub, J. S., R. Guo, L. M. Leeb-Lundberg, J. F. Madden and Y. Daaka (2003). "Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer." *Cancer Res* **63**(9): 2037-41.

Thomas, S. M., N. E. Bhola, Q. Zhang, S. C. Contrucci, A. L. Wentzel, M. L. Freilino, W. E. Gooding, J. M. Siegfried, D. C. Chan and J. R. Grandis (2006). "Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma." *Cancer Res* **66**(24): 11831-9.

Thoren, P. E., D. Persson, P. Isakson, M. Goksoer, A. Onfelt and B. Norden (2003). "Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells." *Biochem Biophys Res Commun* **307**(1): 100-7.

Tiffany, C. W. and R. M. Burch (1989). "Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages." *FEBS Lett* **247**(2): 189-92.

Toledo, C., Matus, C.E., Barraza, X., Arroyo, P., Ehrenfeld, P., Figueroa, C.D., Bhoola, K.D., del Pozo, M., Poblete, M.T. (2012). "Expression of HER2 and bradykinin B1 receptors in precursor lesions of gallbladder carcinoma." *World journal of gastroenterology* **18**(11): 1208-1215.

Tsvetanova, N. G., R. Irannejad and M. von Zastrow (2015). "G protein-coupled receptor (GPCR) signaling via heterotrimeric G proteins from endosomes." *J Biol Chem* **290**(11): 6689-96.

Tudor, C., F. P. Marchese, E. Hitti, A. Aubareda, L. Rawlinson, M. Gaestel, P. J. Blackshear, A. R. Clark, J. Saklatvala and J. L. Dean (2009). "The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages." *FEBS Lett* **583**(12): 1933-8.

Urra, S., C. A. Escudero, P. Ramos, F. Lisbona, E. Allende, P. Covarrubias, J. I. Parraguez, N. Zampieri, M. V. Chao, W. Annaert and F. C. Bronfman (2007). "TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain." *J Biol Chem* **282**(10): 7606-15.

Valdehita, A., A. M. Bajo, A. B. Fernandez-Martinez, M. I. Arenas, E. Vacas, P. Valenzuela, A. Ruiz-Villaespesa, J. C. Prieto and M. J. Carmena (2010). "Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer." *Peptides* **31**(11): 2035-45.

Valdes, G., S. Acuna, A. Munizaga, G. X. Soto and C. D. Figueroa (2016). "Utero-placental cellular and nuclear expression of bradykinin B2 receptors in normal and preeclamptic pregnancies." *Pregnancy Hypertens* **6**(1): 30-7.

Valenti, C., C. Cialdai, S. Giuliani, A. Lecci, M. Tramontana, S. Meini, L. Quartara and C. A. Maggi (2005). "MEN16132, a novel potent and selective nonpeptide kinin B2 receptor antagonist: in vivo activity on bradykinin-induced bronchoconstriction and nasal mucosa microvascular leakage in anesthetized guinea pigs." *J Pharmacol Exp Ther* **315**(2): 616-23.

van Biesen, T., L. M. Luttrell, B. E. Hawes and R. J. Lefkowitz (1996). "Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors." *Endocr Rev* **17**(6): 698-714.

Van Winden, A., M. Gast, J. Beijnen, E. Rutgers, D. Grobbee, P. Peters and C. van Gils (2009). "Validation of previously identified serum biomarkers for breast cancer with SEDI-TOF M: a case control study." *BMC med. Genomics* **2**: 4.

Vaniotis, G., D. Del Duca, P. Trieu, C. V. Rohlicek, T. E. Hebert and B. G. Allen (2011). "Nuclear beta-adrenergic receptors modulate gene expression in adult rat heart." *Cell Signal* **23**(1): 89-98.

Vaniotis, G., I. Glazkova, C. Merlen, C. Smith, L. R. Villeneuve, D. Chatenet, M. Therien, A. Fournier, A. Tadevosyan, P. Trieu, S. Nattel, T. E. Hebert and B. G. Allen (2013). "Regulation of

cardiac nitric oxide signaling by nuclear beta-adrenergic and endothelin receptors." *J Mol Cell Cardiol* **62**: 58-68.

Vazquez-Tello, A., L. Fan, X. Hou, J. S. Joyal, J. A. Mancini, C. Quiniou, R. I. Clyman, F. Gobeil, Jr., D. R. Varma and S. Chemtob (2004). "Intracellular-specific colocalization of prostaglandin E2 synthases and cyclooxygenases in the brain." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**(5): R1155-63.

Vieira, A. V., C. Lamaze and S. L. Schmid (1996). "Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis." *Science* **274**(5295): 2086-9.

Villardaga, J. P., F. G. Jean-Alphonse and T. J. Gardella (2014). "Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling." *Nat Chem Biol* **10**(9): 700-6.

Villanueva, J., D. R. Shaffer, J. Philip, C. A. Chaparro, H. Erdjument-Bromage, A. B. Olshen, M. Fleisher, H. Lilja, E. Brogi, J. Boyd, M. Sanchez-Carbayo, E. C. Holland, C. Cordon-Cardo, H. I. Scher and P. Tempst (2006). "Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns." *J Clin Invest* **116**(1): 271-84.

Vincent, K., V. M. Cornea, Y. J. Jong, A. Laferriere, N. Kumar, A. Mickeviciute, J. S. Fung, P. Bandegi, A. Ribeiro-da-Silva, K. L. O'Malley and T. J. Coderre (2016). "Intracellular mGluR5 plays a critical role in neuropathic pain." *Nat Commun* **7**: 10604.

Vlahopoulos, S. and V. C. Zoumpourlis (2004). "JNK: a key modulator of intracellular signaling." *Biochemistry (Mosc)* **69**(8): 844-54.

von Zastrow, M. and A. Sorkin (2007). "Signaling on the endocytic pathway." *Curr Opin Cell Biol* **19**(4): 436-45.

Vravec, R. and J. Stewart (1985). "Competitive antagonists of bradykinin." *Peptides* **6**: 161-164.

Vravec, R., Stewart JM (1985). Development and modification of competitive antagonists of bradykinin. Am Pep Symp. p. 655-658.

Wang, D. Z., L. Chao and J. Chao (1996). "Cellular localization of bradykinin B1 receptor mRNA in the human kidney." *Immunopharmacology* **33**(1-3): 151-6.

Wang, N., Q. L. Wu, Y. Fang, H. Q. Mai, M. S. Zeng, G. P. Shen, J. H. Hou and Y. X. Zeng (2005). "Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome." *J Transl Med* **3**: 26.

Watson, P. H., L. J. Fraher, B. V. Natale, M. Kisiel, G. N. Hendy and A. B. Hodsmann (2000). "Nuclear localization of the type 1 parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum-induced cell proliferation." *Bone* **26**(3): 221-5.

Webster, M.E. (1970). Kallikreins in glandular tissues. Bradykinin, kallidin and kallikreins. E. G. Erdos. Springer Verlag: 131-135.

Weinberg, R.E. (2007). The biology of cancer. New York, Garland Science, first edition, p. 864.

Whalley, E. T., C. D. Figueroa, L. Gera and K. D. Bhoola (2012). "Discovery and therapeutic potential of kinin receptor antagonists." *Expert Opin Drug Discov* **7**(12): 1129-48.

Woo, R. A. and R. Y. Poon (2003). "Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells." *Cell Cycle* **2**(4): 316-24.

Wright, J. K., J. H. Botha and S. Naidoo (2008). "Influence of the kallikrein-kinin system on prostate and breast tumour angiogenesis." *Tumour Biol* **29**(2): 130-6.

Xie, P., D. D. Browning, N. Hay, N. Mackman and R. D. Ye (2000). "Activation of NF-kappa B by bradykinin through a Galpha(q)- and Gbeta gamma-dependent pathway that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt." *J Biol Chem* **275**(32): 24907-14.

Xu, D., G. R. Borges, J. L. Grobe, C. J. Pelham, B. Yang and C. D. Sigmund (2009). "Preservation of intracellular renin expression is insufficient to compensate for genetic loss of secreted renin." *Hypertension* **54**(6): 1240-7.

Yam, C. H., T. K. Fung and R. Y. Poon (2002). "Cyclin A in cell cycle control and cancer." *Cell Mol Life Sci* **59**(8): 1317-26.

Yaqoob, M., C. R. Snell and G. M. Burgess (1995). "Carbohydrate analysis of the B2 bradykinin receptor from rat uterus." *J Neurochem* **65**(3): 1290-6.

Zhang, J., S. S. Ferguson, L. S. Barak, S. R. Bodduluri, S. A. Laporte, P. Y. Law and M. G. Caron (1998). "Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 7157-62.

Zhang, X., V. Brovkovich, Y. Zhang, F. Tan and R. A. Skidgel (2015). "Downregulation of kinin B1 receptor function by B2 receptor heterodimerization and signaling." *Cell Signal* **27**(1): 90-103.

Zhao, Y., Y. Xue, Y. Liu, W. Fu, N. Jiang, P. An, P. Wang, Z. Yang and Y. Wang (2005). "Study of correlation between expression of bradykinin B2 receptor and pathological grade in human gliomas." *Br J Neurosurg* **19**(4): 322-6.

Zhou, X., G. N. Prado, L. Taylor, X. Yang and P. Polgar (2000). "Regulation of inducible bradykinin B1 receptor gene expression through absence of internalization and resensitization." *J Cell Biochem* **78**(3): 351-62.

Zhu, T., F. Gobeil, A. Vazquez-Tello, M. Leduc, L. Rihakova, M. Bossolasco, G. Bkaily, K. Peri, D. R. Varma, R. Orvoine and S. Chemtob (2006). "Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE2, PAF, and LPA1 receptors." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(3-4): 377-91.

Ziegler, A., P. Nervi, M. Durrenberger and J. Seelig (2005). "The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence." *Biochemistry* **44**(1): 138-48.

Zimmerman, B., M. Simaan, M. Y. Akoume, N. Hourri, S. Chevallier, P. Seguela and S. A. Laporte (2011). "Role of sarrestins in bradykinin B2 receptor-mediated signalling." *Cell Signal* **23**(4): 648-59.

# ANNEXES

# ANNEXE 1

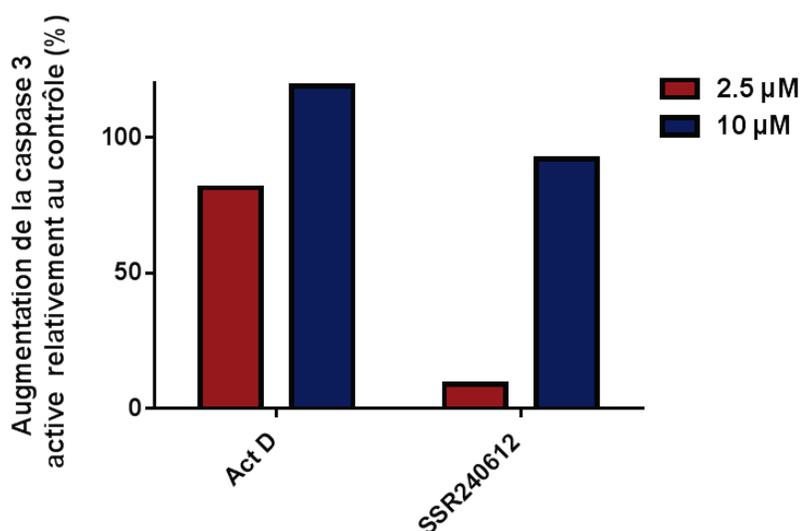


Figure 27: Implication de la caspase 3 dans les mécanismes d'action de l'antagoniste rB1 SSR240612.

Mesure de l'activation de la caspase 3 par cytométrie de flux après traitement des cellules MDA-MB-231 avec l'antagoniste rB1 SSR240612. L'actinomycine D (Act D) a été utilisée comme contrôle positif dans les essais.

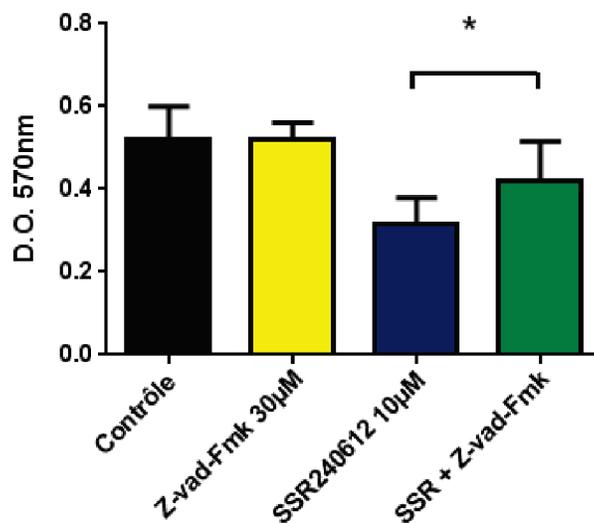


Figure 28: Implication des caspases dans l'effet anti-prolifératif de l'antagoniste perméant rB1 SSR240612.

Les cellules ont été traitées avec l'inhibiteur général des caspases z-VAD-fmk (30μM) pendant 1h à 37°C puis mis en présence ou non avec le SSR240612 à la concentration indiquée. Le MTT a été réalisé 72h après le dernier traitement. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de n=8 avec \*  $p < 0.05$  comparativement au contrôle selon un test T de Student non païré.

## ANNEXE 2

## 1. Introduction

Pour transposer *in vivo* les résultats des expériences *in vitro* montrant l'efficacité de certains antagonistes perméants à freiner la prolifération et induire l'apoptose des cellules MDA-MB-231, nous avons débuté une étude *in vivo* limitée en utilisant un modèle murin de xénogreffes sous-cutanées de tumeur MDA-MB-231. La croissance et l'activité tumorale des souris implantées ont été mesurées respectivement avec un vernier ainsi que par tomographie d'émission de positrons (TEP) à l'aide du traceur  $^{18}\text{F}$ -fluorodéoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG; Gludéf®), un analogue du glucose radiomarqué. Le  $^{18}\text{F}$ -FDG s'accumule dans les cellules métaboliquement actives comme les cellules cancéreuses mais contrairement au glucose, ne peut être dégradé par celles-ci via la glycolyse. Le radiotracer peut ensuite être visualisé grâce à un scanner TEP comprenant un anneau de détecteurs formés de cristaux capables de capter l'émission des positrons du fluor18, l'élément radioactif contenu dans le  $^{18}\text{F}$ -FDG. La technique d'imagerie TEP nous permet donc de suivre la progression tumorale tout au long d'un traitement et ce, de manière non-invasive. Nous présentons ci-dessous les méthodes et résultats tirés de ces expériences préliminaires.

## 2. Matériel et méthodes

### *Xénogreffes de tumeurs et traitements in vivo*

Des souris Balb/c nu/nu (4 semaines) ont été achetées de Charles River Laboratories puis  $10 \times 10^6$  cellules resuspendues dans un mélange de 50  $\mu\text{l}$  de matrigel (BD biosciences, Bedford, MA, USA) et 50  $\mu\text{l}$  de HBSS ont été implantées par injection sous-cutanée sur les hanches. La croissance tumorale (en  $\text{mm}^3$ ) a été suivie à l'aide d'un vernier jusqu'à ce que les tumeurs atteignent environ 100  $\text{mm}^3$  et les souris ont ensuite été traitées avec l'antagoniste FR173657 (1 mg/kg; volume finale 30  $\mu\text{l}$ ) ou le véhicule (constitué d'une solution isotonique de saline stérile contenant 5% de DMSO; groupe contrôle (ctl)) par injection intra-tumorale tous les 48h pendant 14 jours. Les dimensions des tumeurs ont été mesurées avec un vernier à tous les deux jours avant, pendant et après le traitement et le volume ( $\text{mm}^3$ ) des tumeurs calculé avec la formule  $\frac{1}{2}(\text{longueur} \times \text{largeur}^2)$  (Jensen *et al.* 2008), le premier jour de traitement étant considéré comme le jour 0. Toutes les expérimentations animales ont été faites avec l'approbation du comité

d'éthique animal institutionnel et respectaient les lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux.

### *Imagerie TEP*

L'imagerie TEP a été réalisée sur un scanner pour petits animaux de type LabPET8 (Gamma Medica-IDEAS Inc., Sherbrooke, Québec, Canada) possédant un champ de 7.5 cm. Les souris Balb/c nu/nu xénogreffées ont été injectées avec 15 MBq (400  $\mu$ Ci; 100  $\mu$ l) de  $^{18}\text{F}$ -FDG par la veine caudale sous anesthésie à l'isoflurane/oxygène (1 L/min). La température des animaux a été surveillée et maintenue par un système d'air forcé. Des scans de type DSD (*double sampling discrete*) de 60 min immédiatement après injection ont été réalisés. Les images TEP ont ensuite été reconstruites et des régions d'intérêts ont été tracées sur les zones tumorales. Les résultats de la concentration d'activité du traceur dans les tumeurs sont exprimés en kBq/ $\mu$ l de tumeur et sont normalisés en fonction d'une mire. Brièvement, un contenant cylindrique a été rempli d'un volume d'eau précis et d'une quantité de  $^{18}\text{F}$ -FDG connue puis scanné pendant 5 min. L'image TEP a ensuite été reconstruite et le taux de comptage de la mire a été comparé avec la concentration d'activité connue pour obtenir un facteur de calibration.

### **3. Résultats**

Dans un premier temps, la mesure du volume des tumeurs lors du traitement avec l'antagoniste perméant rB2 FR173657 a permis de démontrer que celui-ci diminuait le volume de la tumeur comparativement aux groupes contrôles (Figure 29, A).

L'imagerie TEP (Figure 29, B) au  $^{18}\text{F}$ -FDG nous a quant à elle permit d'observer une diminution du métabolisme tumoral lorsque la tumeur était traitée avec le FR173657 comparativement à la tumeur contrôle non traitée (Figure 29, C). On remarque une croissance rapide de la tumeur contrôle suivi d'une diminution de la pente de la courbe au jour 20 après le début du traitement (Figure 29, C). Cette diminution du métabolisme tumoral indique généralement la nécrose de la tumeur.

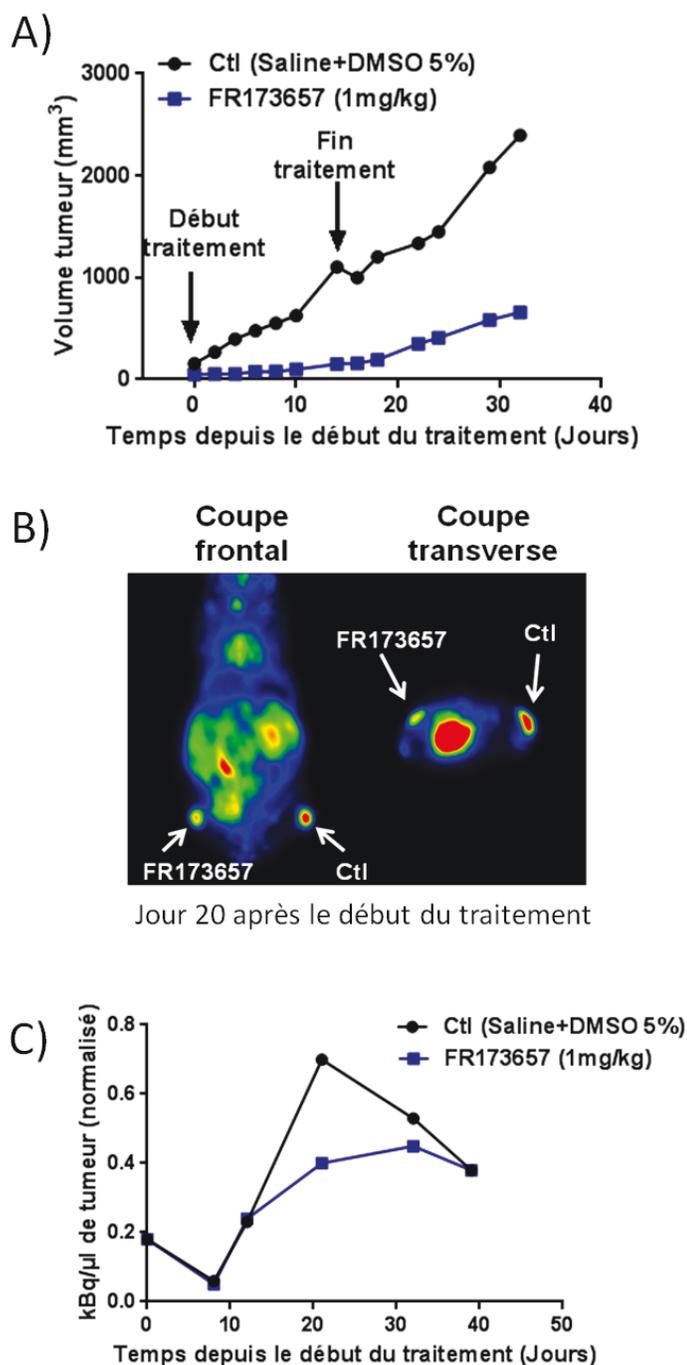


Figure 29: Effets *in vivo* de l'antagoniste rB2 perméant FR173657 chez les souris balb/c nu/nu porteuses de xénogreffes de cancer du sein MDA-MB-231. Effet d'un traitement intratumoral avec l'antagoniste perméant rB2 FR173657 ou son véhicule (de la saline contenant 5% DMSO) sur le développement temporel du volume (A) et de l'activité métabolique tumorale en imagerie TEP (B). La quantification du métabolisme glucidique des tumeurs examinées en TEP est représentée dans le panneau C.

Nous avons également étudié l'effet de l'inactivation du gène rB2 sur la croissance tumorale *in vivo* en implantant les lignées scrRNA et shRNA1 sur des souris, chaque souris ayant une tumeur de chaque lignée ce qui permet à une même souris d'être son propre contrôle. Tout comme dans les tests de prolifération *in vitro*, nous avons pu observer que la lignée dont le gène rB2 avait été inactivée croît beaucoup moins rapidement que la lignée contrôle qui exprime rB2 (Figure 30, A), résultats qui sont confirmés par l'imagerie TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG et la quantification de l'activité métabolique des cellules cancéreuses (Figure 30, B et C respectivement).

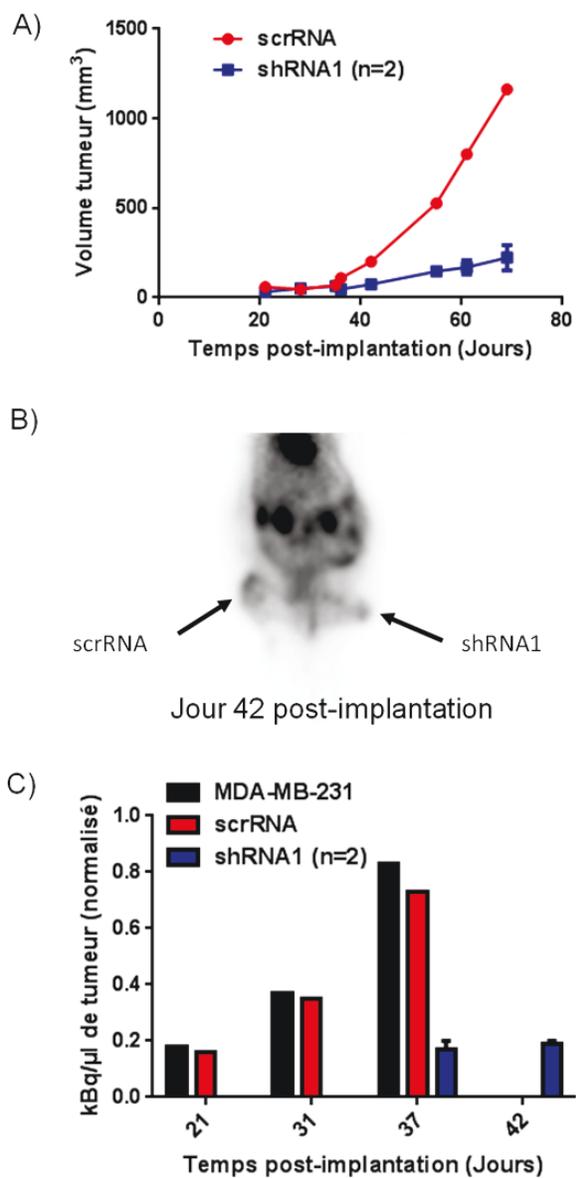


Figure 30: Effet de l'inactivation du gène rB2 (shRNA1) sur la croissance tumorale de MDA-MB-231.

## 1. Discussion et conclusion

Les résultats obtenus *in vivo* vont donc dans le même sens que ceux *in vitro* réalisés dans le cadre de cette étude et laissent présager qu'il serait possible de traiter des tumeurs solides surexprimant des récepteurs des kinines intracellulaires/nucléaires. Nous avons opté pour l'administration locale ou intratumorale pour d'une part faciliter la comparaison de l'efficacité anti-cancéreuse des antagonistes ayant possiblement des propriétés pharmacocinétiques différents (molécules peptidiques versus non-peptidiques) et d'autre part, limiter les effets systémiques possibles des antagonistes des kinines. Il n'est pas exclu cependant que ces mêmes antagonistes puissent agir de manière efficace lorsqu'administrés par voie intraveineuse, le mode d'administration le plus courant ou privilégié pour la chimiothérapie. Bien que cela reste à prouver, ces mêmes agents pourraient rester actifs même par voie orale tel que démontré pour d'autres analogues antagonistes des kinines (Stewart *et al.* 1997).

## ANNEXE 3

Publications de l'auteureArticles:

- 10- M. Savard, J. Labonté, **C. Dubuc**, W. Neugebauer, P. D'Orléans-Juste, F. Jr Gobeil (2013). *Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin B2 receptor agonist*. Biol. Chem. 394 (3): 353-360.
- 9- J. Côté, V. Bovenzi, M. Savard, **C. Dubuc**, A. Fortier, W. Neugebauer, L. Tremblay, W. Muller-Esterl, AM. Tsanaclis, M. Lepage, D. Fortin, F. Jr Gobeil (2012). *Induction of selective blood-brain barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model*. PLoS One 7(5): e37485.
- 8- M. Re, M. Pampillo, M. Savard, **C. Dubuc**, CA. McArdle, RP. Millar, PM. Conn, F Jr Gobeil, M. Battacharya, AV. Babwah (2010). *The human gonadotropin releasing hormone type I receptor is a functional intracellular GPCR expressed on the nuclear membrane*. PLoS One 5(7): e11489.
- 7- B. Guérin, V. Dumulon-Perreault, M-C. Tremblay, S. Ait-Mohand, P. Fournier, **C. Dubuc**, F. Bénard (2009). *[Lys(DOTA)<sup>4</sup>]BVD15, a novel and potent neuropeptide Y analog designed for Y<sub>1</sub> receptor-targeted breast tumor imaging*. Bioorg. Med. Chem. Letters 20: 950-953.
- 6- J. Côté, M. Savard, V. Bovenzi, **C. Dubuc**, AM. Tsanaclis, D. Fortin, M. Lepage, F. Jr Gobeil (2009). *Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe<sup>δ</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Arg<sup>9</sup>]-BK in a F98 glioma rat model: a MRI study*. Neuropeptides 40: 177-185.
- 5- J. Côté, M. Savard, V. Bovenzi, S. Bélanger, J. Morin, W. Neugebauer, A. Larouche, **C. Dubuc**, F. Jr Gobeil (2009). *Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles*. Peptides 30(4): 788-795.
- 4- **C. Dubuc**, R. Langlois, F. Bénard, N. Cauchon, K. Klarskov, P. Tone, JE. Van Lier (2008). *Targeting gastrin-releasing peptide receptors of prostate cancer cells for photodynamic therapy with a phthalocyanine-bombesin conjugate*. Bioorg. Chem. Med. Letters 18: 2424-2427.

- 3- S. Authier, S. Tremblay, V. Dumulon-Perreault, **C. Dubuc**, R. Ouellet, R. Lecomte, S. Cunnane, F. Bénard (2008). *<sup>11</sup>C acetoacetate utilization by breast and prostate tumors: a PET and biodistribution study in mice*. Mol. Imaging Biol. 10(4): 217-223.
- 2- F. Bénard, N. Ahmed, JM. Beauregard, J. Rousseau, A. Aliaga, **C. Dubuc**, E. Croteau, JE. Van Lier (2008). *<sup>18</sup>F fluorinated estradiol derivatives for receptor estrogen imaging: impact of substituents formulation and specific activity on the biodistribution in breast tumor-bearing mice*. Eur. J. Nucl. Med Mol Imaging 35(8): 1473-1479.
- 1- N. Ahmed, **C. Dubuc**, J. Rousseau, F. Bénard, JE. Van Lier (2007). *Synthesis, characterization and estrogen receptor binding affinity of flavone-, indole- and furan-estradiol conjugates*. Bioorg. Med. Chem. Letters 17(11): 3212-3216.

Communications:

- 25- F. Jr Gobeil, M. Savard, V. Dumulon-Perreault, **C. Dubuc**, E. Croteau, S. Ait-Mohand, B. Guérin (2016). Theranostic potential of a new  $^{64}\text{Cu}$ -labeled R954 conjugate for kinin B1R positive tumors. SNMMI annual meeting, San Diego. J Nucl Med 57 (suppl. 2): 71.
- 24- F. Jr Gobeil, M. Savard, S. Ait-Mohand, J. Côté, **C. Dubuc**, V. Dumulon-Perreault, M. Paquette, E. Croteau, B. Guérin (2015). Novel kinin-based analogues as potential BBB-penetration enhancers for delivery of chemotherapy and as new theranostic agents for imaging and treatment of malignant brain cancers. Kinin 2015, Brésil. (Programme, p. 91).
- 23- **C. Dubuc**, M. Savard, V. Bovenzi, F. Jr Gobeil. Étude l'expression des récepteurs B1 des kinines chez différentes lignées de cancer du sein humain. CRCQ 2013, 55<sup>e</sup> réunion annuelle, Lac Delage, Québec. (Programme p. 151).
- 22- M. Savard, **C. Dubuc**, J. Labonté, P. D'Orléans-Juste, F. Jr Gobeil. Évaluation approfondie des caractéristiques pharmacologiques d'un nouvel agoniste du récepteur B2 de la bradykinine. 4<sup>e</sup> Journée Phare, Orford, Québec, 16 novembre 2011. (Programme p. 43).
- 21- **C. Dubuc**, M. Savard, V. Bovenzi, W. Neugebauer, F. Jr Gobeil. Arrêt de la prolifération et induction de l'apoptose des cellules humaines de cancer du sein par des antagonistes perméants des récepteurs B2 de la bradykinine. CRCQ 2012, 54<sup>e</sup> réunion annuelle, Orford, Québec. (Programme p. 124).
- 20- M. Savard, J. Labonté, A. Tremblay, **C. Dubuc**, W. Neugebauer, GE. Plante, P. D'Orléans-Juste, F. Jr Gobeil. *Further pharmacological evaluation of a novel peptide bradykinin B2 receptor agonist*. Kinin 2012, Paris. (Programme p. 53).
- 19- J. Côté, V. Bovenzi, M. Savard, **C. Dubuc**, M. Lepage, D. Fortin, F. Jr Gobeil. *Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model*. Kinin 2012, Paris. (Programme p. 52).

- 18- **C. Dubuc**, V. Bovenzi, M. Savard, W. Neugebauer, F. Jr Gobeil. *Induction of growth arrest and apoptosis of human breast cancer cells with cell-penetrating kinin B2 receptor antagonists*. Kinin 2012, Paris. (Programme p. 50).
- 17- **C. Dubuc**, V. Bovenzi, M. Savard, A. Fortier, F. Jr Gobeil. Effets cytocide et cytotoxique des antagonistes perméables des récepteurs B2 de la bradykinine chez les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. 41<sup>e</sup> journée scientifique de la Faculté de médecine et des sciences de la santé, Sherbrooke, Québec, 28 mars 2012. (Programme p. 37).
- 16- **C. Dubuc**, V. Bovenzi, M. Savard, A. Fortier, F. Jr Gobeil. Effets cytocide et cytotoxique des antagonistes perméables des récepteurs B2 de la bradykinine chez les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. 3<sup>e</sup> journée Phare, Orford, Québec, novembre 2011. (Programme p. 95).
- 15- F. Jr Gobeil, J. Côté, M. Savard, V. Bovenzi, **C. Dubuc**, M. Lepage M, D. Fortin, *Potential use of synthetic kinin B1 receptor agonists as permeability enhancers for improving drug delivery to malignant brain tumours*. 2011 CSPT conférence annuelle. J Popul Ther Clin Pharmacol 18: e342-343.
- 14- M. Savard, W. Neugebauer, J. Côté, **C. Dubuc**, V. Bovenzi, F. Jr Gobeil. *Pharmacological evaluation of novel fluorescently-labeled analogs of Icatibant*. 22<sup>e</sup> American Peptide Symposium. Biopolymers Peptide Scie 96(4): 511.
- 13- **C. Dubuc**, V. Bovenzi, M. Savard, A. Fortier, F. Jr Gobeil. Étude in vitro de l'expression des kinines et de leurs récepteurs chez des lignées de glioblastomes humains. 2<sup>e</sup> journée Phare, Sherbrooke, Québec, novembre 2010. (Programme p.31).
- 12-**C. Dubuc**, V. Bovenzi, M. Savard, A. Fortier, F. Jr Gobeil. Les récepteurs B1 et B2 et certains autres composants du système kinine sont exprimés de manière endogène dans différentes lignées de gliomes humains. CRCQ 2010, 52<sup>e</sup> réunion annuelle, Bromont, Québec. (Programme p. 91).
- 11- J. Côté, M. Savard, **C. Dubuc**, V. Bovenzi, M. Lepage, D. Fortin, F. Jr Gobeil. Étude in vivo sur l'extravasation d'agents de contraste induite par l'activation des récepteurs B2 de la bradykinine dans le modèle de gliome de rat F98. CRCQ 2010, 52<sup>e</sup> réunion annuelle, Bromont, Québec. (Programme p. 186).

- 10- M. Savard, J. Côté, **C. Dubuc**, V. Bovenzi, W. Neugebauer, F. Jr Gobeil. Nouveaux analogues fluorescents de l'Icatibant. CRCQ 2010, 52<sup>e</sup> réunion annuelle, Bromont, Québec. (Programme p. 177).
- 9- V. Dumulon-Perreault, F. Bénéard, **C. Dubuc**, P. Fournier, S. Authier, MC. Tremblay, R. Langlois, S. Ait Mohand. B. Guérin. *In vitro* characterization of a novel peptide heterodimer for specific breast cancer PET imaging. 2<sup>e</sup> réunion annuelle du World Molecular Imaging Congress (WMIC), Montréal, Québec, septembre 2009.
- 8- B. Guérin, V. Dumulon-Perreault, **C. Dubuc**, MC. Tremblay, R. Langlois, S. Ait Mohand. F. Bénéard. <sup>64</sup>Cu-(DOTA)BVD15/BBN(6-14) as a novel dual-action peptide for breast cancer imaging. 56<sup>e</sup> réunion annuelle de la Society of Nuclear Medicine (SNM) 2009, Toronto, Ontario, juin 2009.
- 7- S. Authier, S. Tremblay, **C. Dubuc**, V. Dumulon-Perreault, R. Ouellet, R. Lecomte, SC. Cunnane, F. Bénéard. *Évaluation du [<sup>11</sup>C]acetoacetate en tant que traceur TEP pour l'imagerie du cancer*. Journée de la Recherche 2008, Sherbrooke, Québec.
- 6- V. Dumulon-Perreault, B. Guérin, **C. Dubuc**, S. Authier, M. Khan, R. Lecomte, F. Bénéard. *<sup>64</sup>Cu-DOTA-Lys<sup>4</sup>-BVD15, un agent d'imagerie TEP du cancer du sein*. Journée de la Recherche 2008, Sherbrooke, Québec.
- 5- B. Guérin, V. Dumulon-Perreault, S. Authier, **C. Dubuc**, F. Bénéard. *Radiolabeled peptide heterodimer to improve breast and prostate cancer diagnosis by positron emission tomography*. 55<sup>e</sup> réunion annuelle de la Society of Nuclear Medicine (SNM) 2008, Nouvelle-Orléans, Louisiane, juin 2008.
- 4- **C. Dubuc**, MC. Tremblay, R. Langlois, E. Croteau, V. Dumulon-Perreault, S. Authier, R. Lecomte, F. Bénéard. *Suitability of <sup>64</sup>Cu-DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH<sub>2</sub> as an agent for tumoral breast and prostate cancer imaging*. 54<sup>e</sup> réunion annuelle de la Society of Nuclear Medicine (SNM) 2007, Washington DC, juin 2007.
- 3- S. Authier, S. Tremblay, V. Dumulon-Perreault, **C. Dubuc**, R. Ouellet, R. Lecomte, SC. Cunnane, F. Bénéard. *Ketone body utilization by breast and prostate tumor*. 54<sup>e</sup> réunion annuelle de la Society of nuclear medicine (SNM) 2007, Washington DC, juin 2007.

- 2- F. Bénard, A. Aliaga, N. Ahmed, C. St-Pierre, **C. Dubuc**, J. Rousseau, E. Croteau, JM. Beauregard, JE. Van Lier. *Biodistribution of fluorinated estradiol derivatives in ER<sup>+</sup> tumor-bearing mice: impact of substituents, formulation and specific activity*. 50<sup>e</sup> réunion annuelle de la Society of Nuclear Medicine (SNM) 2003, Toronto, juin 2003.
- 1- E. Croteau, F. Bénard, **C. Dubuc**, M. Archambault, M. Bentourkia, J. Cadorette, R. Lecomte. *Correction of metabolite and spillover for myocardial blood flow with ammonia in small animal PET*. 50<sup>e</sup> réunion annuelle de la Society of Nuclear Medicine (SNM) 2003, Toronto, juin 2003.